جامعة دمشق
كلية الطب البشري



التعدد الشكلي لجينة الفيكولين FCN عند مرضى الليشمانية الجلدية

FCN gene polymorphism in patients with cutaneous leishmaniasis

بحث علمي أعد لنيل درجة الدكتوراه في الطفيليات

إعداد المعيدة أمال عساف

إشراف الأستاذة الدكتورة
عائدة الخيمي

رئاسة وإشراف مشارك
الأستاذة المساعدة الدكتورة
الهام حرفوش

بالتعاون مع البروفسور Juergen Kun
أستاذ الطفيليات البشرية في معهد الطب المداري
جامعة توبنجن –المانيا

2011

الإهداء

إلى من لفحته الشمس بوهج حرارتها فقلب صحراء حياتنا جنة من الياسمين
إلى من جعل من عرق جبينه خبز حياتنا

أبي

إلى من جعلت من حياتها ممرا يفضي بنا إلى شواطئ المستقبل
إلى كل دمعة غالية سارت من عينيها الحالمتين عند لقائي ووداعي

أمي

إلى الروح التي سكنت روحي
إلى رفيق دربي الذي طالما أوصاني بالصبر وأحيى بي بصيص الأمل

زوجي

إلى بسمة يومي وإشراقة حياتي وأمل غدي
إلى من منح ذاتي وجودها ووهب روحي فرحها

ولديّ

إلى من شاركوني الهموم وساعدوني على تخطي الصعاب
إلى من وقف إلى جانبي عندما ضللت الطريق

أخوتي

إلى من أكبر بمحبتهم وثقتهم
إلى من أعتز بوجودهم إلى جانبي

أهل زوجي

إلى من عشت معهم وعاشوا بداخلي
إلى من أحيا بحبهم ووفائهم

أصدقائي

إلى من كانوا نبراسا للعلم وتاجا للمعرفة
إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة

أساتذتي

إلى كل من يسعى لخير البشر وسعادة الإنسان
إلى كل من أحب أهدي عملي هذا

الدكتورة أمال عساف

كلمة شكر

وتمر الأيام وتنقضي السنون لأصل إلى منعطف آخر من منعطفات دروب الحياة، ولابد هنا من الوقوف لحظة لأستذكر أوقات سعيدة وأنظر بعين تفيض بالشكر والاحترام إلى كل من مد يد العون لإنجاز هذا البحث وأخص بالشكر وزارة الصحة ومراكز مكافحة الليشمانية لما أبدته من تعاون أثناء العمل، وكذلك الأمر مستشفى الأمراض الجلدية والزهرية الجامعي ومخبر البحوث والاستشارات الوراثية في كلية الطب البشري.

كما أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذة: عائدة الخيمي المشرفة على هذا البحث والأستاذة الهام حرفوش المشرفة المشاركة على هذا البحث التي أعطتني من وقتها وجهدها الساعات الطوال دون كلل أو ملل فكانت خير معين على تنفيذ هذا العمل.

وكل الشكر لأعضاء لجنة الحكم المؤلفة من الأساتذة : يوسف زريق، إميل شاهين، صالح داوود ، عبير الكفري التي لم تبخل يوما بتقديم التوجيهات والنصائح المفيدة .

كما أخص بالشكر هيئة التبادل الأكاديمي الألماني DAAD التي أمدتني بالمنحة الدراسية لمدة ستة أشهر فكانت فرصة ذهبية استطعت من خلالها إجراء الجزء الأكبر من الدراسة العملية .

كما أتقدم بالشكر والعرفان للبروفسور يوركن كون أستاذ الطفيليات البشرية في معهد الطب المداري في جامعة توبنجن –ألمانيا لما أعطاني من وقته وعلمه أثناء تنفيذ العمل وتابع شخصيا كل مراحل العمل المخبري وتفسير نتائجه.

وعظيم الشكر والعرفان لأسرة كلية الطب البشري ممثلة بعميد الكلية ونائبا العميد لجهودهم في دفع مسيرة البحث العلمي وأيضا كل المحبة والتقدير للأساتذة والزملاء والعاملين في هذا الصرح العظيم.

رغم أنني أطلت إلا أنني قد أكون نسيت وتبقى كلمات الشكر عاجزة عن أن توفي ولو جزء يسير من حقوق أصحابها، فالشكر كل الشكر لمن ذكرت والعذر والسماح ممن نسيت.

الدكتورة أمال عساف

1- الدراسة النظرية:

1-1-1- لمحة تاريخية:

تعود قصة الليشمانية الغنية بالأحداث إلى زمن بعيد، فأول وصف لحالة شبيهة بالليشمانية الجلدية يعود إلى حكم آشور بعل في القرن السابع قبل الميلاد، كما أن الأطباء المسلمين ومن ضمنهم ابن سينا في القرن العاشر الميلادي أعطى وصفا لما كان يدعى حبة Balkh sore (1).

ولكن من أوائل من وصفها وصفا سريريا مهما و مفصلا هو Alexander Russell سنة 1756 بعد فحصه لمريض تركي (2) وعرف المرض بعدها بحبة حلب.

بينما أول من لفت النظر إلى داء الليشمانية الحشوية كان مجموعة من الأطباء في الهند وذلك سنة 1824 في مدينة Jessore، حيث اعتقدوا في البداية أنه أحد أشكال الملاريا وفيما بعد أطلق على المرض في الهند الكالا آزار Kala-azar أي الحمى السوداء (3).

أما من اكتشف سبب المرض فهو أمر متنازع عليه فمن المرجح أن الجراح كوينينغهام Cunningham قد شاهده أولا سنة 1885 دون أن يربطه بالمرض (4،5).

سنة 1901 وجد الطبيب الاسكتلندي William Leishman العامل الممرض في لطاخة طحال من مريض توفي من حمى dum-dum وهي بلدة بالقرب من كالكوتا اشتهرت بسوء أوضاعها الصحية، بينما وصفه الايرلندي Charles Donovan سنة 1903 كونه عامل ممرض جديد غير معروف سابقا (2،5)، لاحقا أثبت Ronald Ross علاقته بالمرض وأطلق عليه اسم Leishmania Donovani (2،5) مع أن الطبيب الروسي Borovesky وصف الطفيلي قبل ذلك أيضا وذلك سنة 1898(6)، ولاحقا ربط الأخوان Sergent بين الإصابة بالمرض و العامل الناقل وهو ذبابة الرمل (الفاصدة) Phlebotomus (7،5).

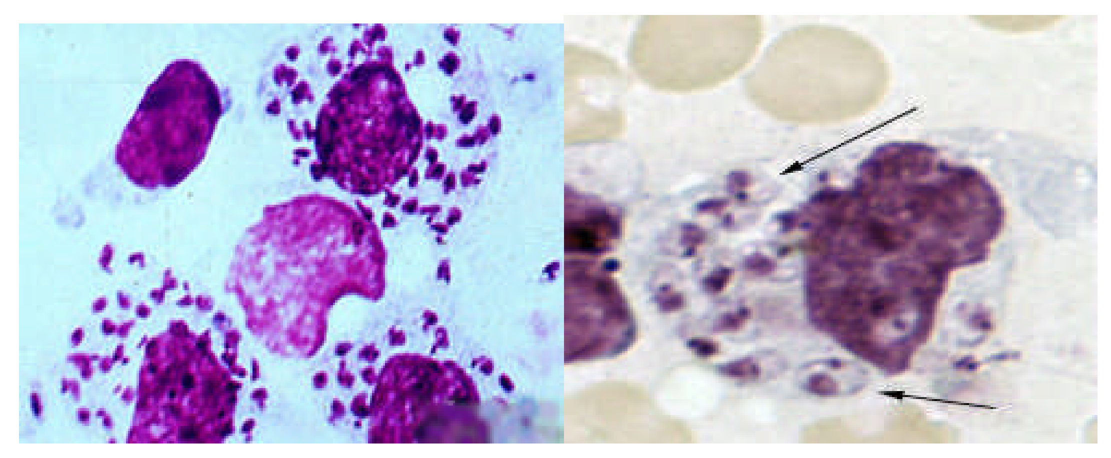
2-1-1- تعريف الطفيلي وشكله:

الليشمانية Leishmania طفيليات وحيدة الخلية تتبع عائلة المثقبيات وهي مجبرة التطفل داخل الخلايا إذ تعيش في الثوي الفقاري داخل خلايا الجهاز الشبكي البطاني والبالعات وتتكاثر فيها بالانشطار الثنائي الطولي ولا تبدي أي مظاهر جنسية.

يميز لطفيلي الليشمانية شكلان رئيسيان هما الشكل عديم السوط (اللاسوطي أو الليشماني) والشكل أمامي السوط (المشيقة).

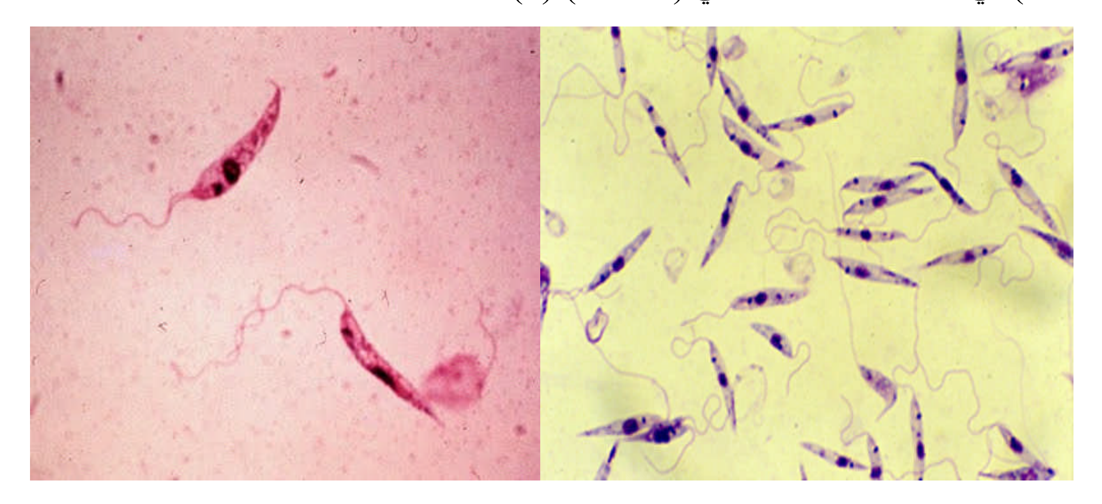
<u>الشكل عديم السوط (اللاسوطي أو الليشماني) Amastigote</u>: ويدعى أيضا جسيم دونوفان، وهو شكل غير متحرك مجبر التطفل داخل خلايا الجهاز الشبكي البطاني، إذ يلاحظ هذا الشكل في فجوات بلعمية في الخلايا المذكورة، يكون الطفيلي دائري أو بيضوي الشكل بقطر 1-3×2-6

μ وتكون إحدى نهايتيه مدورة أكثر من الأخرى، يحوي نواة بيضوية أو دائرية كبيرة نسبيا تتلون بلون أحمر بنفسجي عند تلوين الطفيلي بملون غيمزا كما تتلون الهيولي بلون أزرق شاحب (الشكل 1)، و يشاهد بالقرب من الناحية الأمامية للطفيلي جسم أحمر داكن عصوي الشكل هو الجسيم القاعدي basal body وجانبه منشأ الحركة kintoplast الذي يتلون حمضه النووي بلون بنفسجي.



الشكل (1) الشكل اللاسوطي لليشمانية داخل البالعات.

<u>الشكل أمامي السوط (المشيقة) promastigote</u>: وهو الشكل خارج الخلوي للطفيلي القادر على الحركة، يتواجد في معي الفواصد وفي أوساط الزرع، شكله مغزلي اسطواني أبعاده 2-3 ×15-25μ ويخرج من نهايته الأمامية سوط وحيد طوله من 15-28μ، وعند التلوين بملون غيمزا تبدو الهيولى زرقاء الشاحبة تحوي على نواة مركزية بينما تتوضع بائية الحركة (منشأ الحركة) في النهاية الأمامية للطفيلي (الشكل 2) (8).



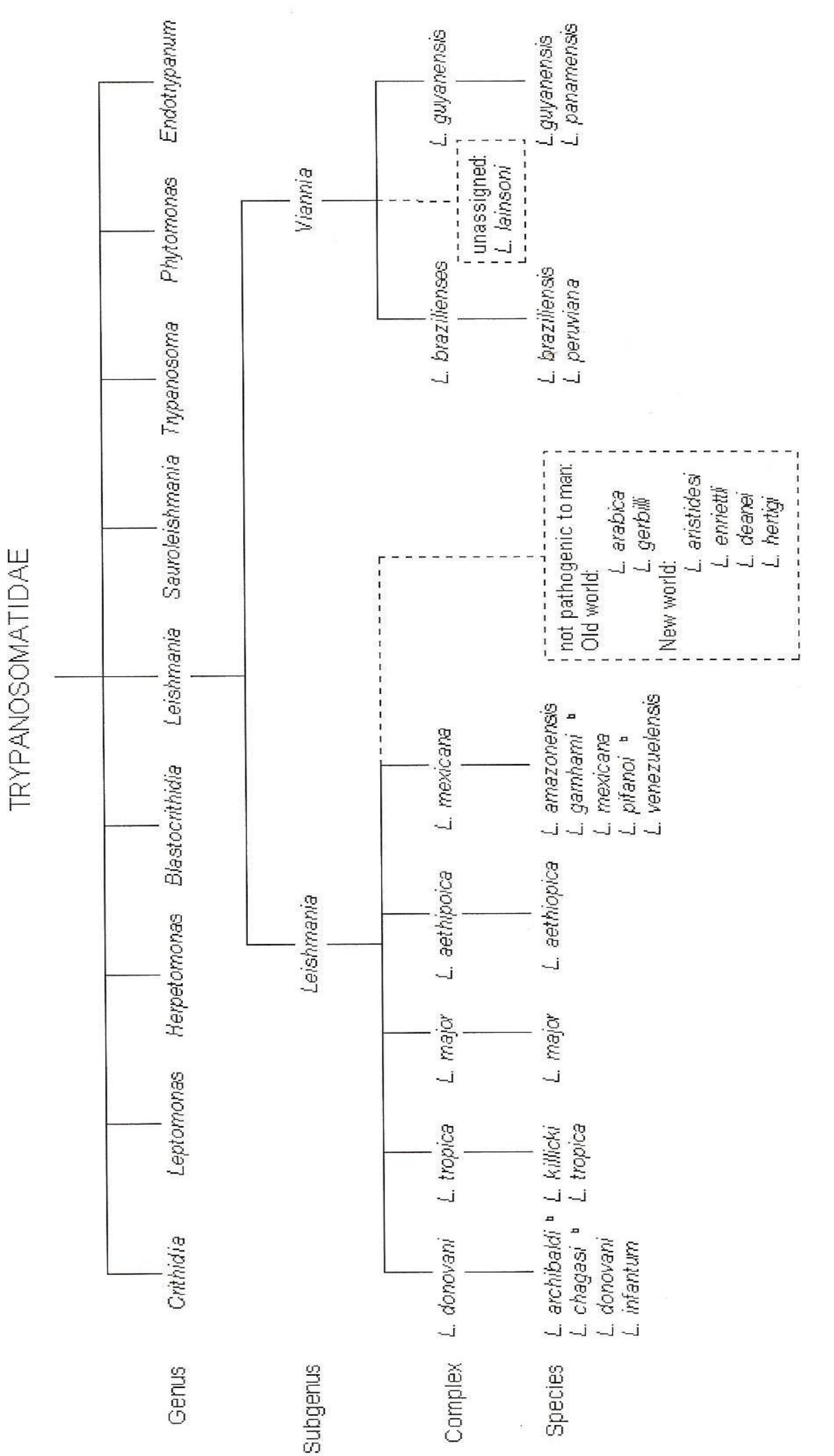
الشكل (2) الشكل أمامي السوط لليشمانية.

3-1-1- التصنيف Classification:

يصنف جنس الليشمانية اعتمادا على منظمة الصحة العالمية Who (9) كما يلي :

المملكة الحيوانية	Kingdom:Animalia
تحت مملكة وحيدات الخلية (الأوالي)	Sub-Kingdom:Protozoa
شعبة السوائط اللحمية	Phylum:Sarcomastigophora
تحت شعبة السوائط	Sub-Phylum:Mastigophora
صنف السوائط الحيوانية	Class:Zoomastigophora
رتبة ذوات منشأ الحركة	Order:Kinetoplastidiae
فصيلة المثقبيات	Family:Trypanosomatidae
جنس الليشمانية	Genus:Leishmania

ويضم جنس الليشمانية أنواعا متعددة صنفت من قبل الصحة العالمية إلى تحت أجنـاس ومعقدات و أنواع (10،11) (الشكل 3).



a: تم اعتماد خصائص الشكل الخارجي في تصنيف الأجناس وتحت الأجناس، بينما اعتمدت خصائص الصفات الداخلية (باستخدام نظائر الأنزيمات Isoenzymes) بشكل رئيسي في تصنيف المعقدات (Complexes). b: لا يعتبر بعض الباحثين هذه الأنواع كأنواع منفصلة.

الشكل (3) تصنيف أنواع الليشمانية حسب معطيات منظمة الصحة العالمية (10).

كما صنفت الليشمانية تبعا للتوزع الجغرافي لأماكن وجود الطفيليات في العالم (12) وذلك كما في الجدول التالي:

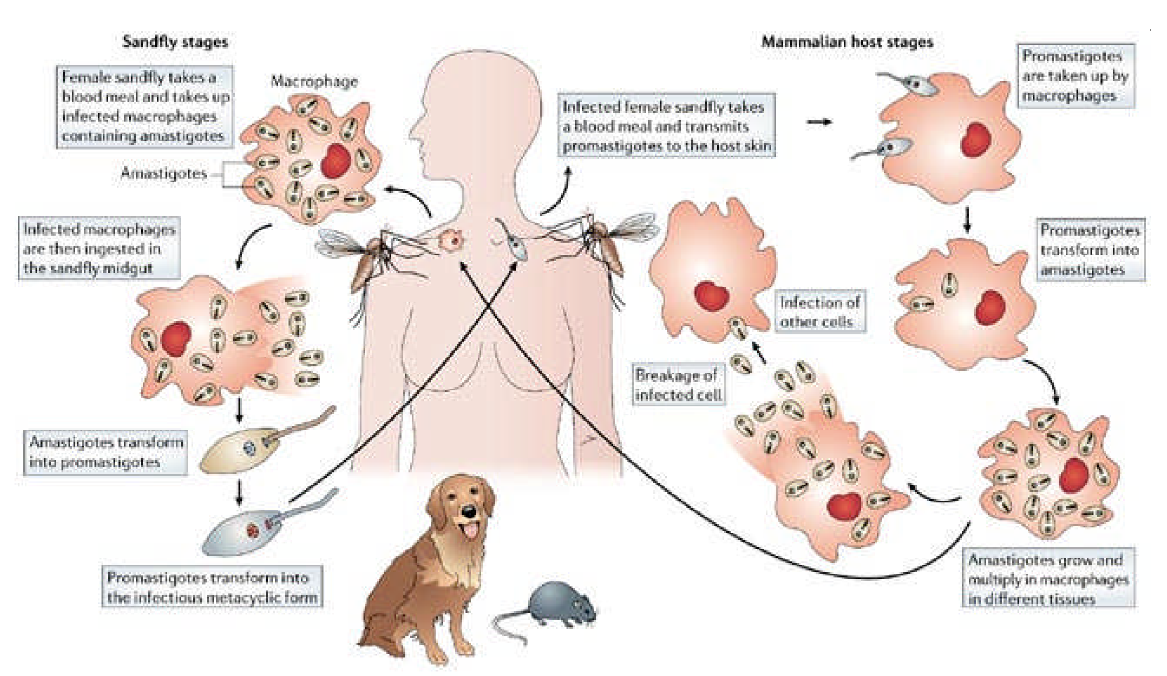
تحت الأجناس	المعقد	الأنواع	التوزع الجغرافي	التظاهرات السريرية الرئيسية	تظاهرات أخرى
العالم القديم					
ليشمانية	ليشمانية دونوفانية	الدونوفانية	الهند ،الصين أفريقيا ،الباكستان	ليشمانية حشوية	ليشمانية جلدية بعد الكلا آزار
		الطفلية	حوض البحر المتوسط، بعض مناطق أفريقيا ،البلقان، الصين	ليشمانية حشوية	ليشمانية جلدية
	الليشمانية الكبيرة	الكبيرة	الشرق الأوسط الهند ، الصين ،أفريقيا ،	ليشمانية جلدية قرحة رطبة	
	الليشمانية المدارية	المدارية	الهند،جنوب أوروبا، غرب أسيا، الشرق الأوسط	ليشمانية جلدية قرحة جافة	ليشمانية ناكسة، ليشمانية منحازة حشويا
	الليشمانية الأثيوبية	الأثيوبية	أثيوبيا، كينيا، اليمن	ليشمانية جلدية	ليشمانية جلدية منتشرة
العالم الجديد					
ليشمانية	الليشمانية الدونوفانية	الشاغاسية	أميركا اللاتينية	ليشمانية حشوية	ليشمانية جلدية لانموذجية
	الليشمانية المكسيكية	الفينزويلية	فينزويلا	ليشمانية جلدية	
		المكسيكية	المكسيك ،أميركا الوسطى ،تكساس	ليشمانية جلدية	ليشمانية جلدية منتشرة
		الأمازونية	حوض الأمازون البرازيل	ليشمانية جلدية	ليشمانية جلدية منتشرة وسجلت حالات من الحشوية
فينا	الليشمانية البرازيلية	البرازيلية	أميركا اللاتينية	ليشمانية جلدية وجلدية مخاطية	
		البيروفية	مرتفعات البيرو والأرجنتين	ليشمانية جلدية	
	الغويانية	الغويانية	حوض الأمازون الشمالي البرازيل	ليشمانية جلدية	
		البانامية	باناما،كوستاريكا، كولومبيا	ليشمانية جلدية	

الجدول (1) تصنيف الليشمانية حسب توزعها الجغرافي.

4-1-1- دورة حياة الطفيلي Life cycle of leishmania parasite:

يعد طفيلي الليشمانية ثنائي الثوي، فهو يحتاج لإتمام دورة حياته إلى أنثى الفاصدة التي تقوم بدور ناقل حيوي مشكلة الثوي الأول، أما الثوي النهائي فهو الإنسان أو الكلاب أو القوارض (8).

تبدأ دورة الحياة بلدغ أنثى الفاصدة للثوي المصاب بالليشمانية، حيث تأخذ مع وجبتها الدموية الشكل عديم السوط لليشمانية التي تصل بعدها إلى معي الفاصدة ،لتتحول بعد72 ساعة إلى أشكال متطاولة مغزلية مجهزة بسوط أمامي وحيد وتتكاثر بالانشطار الثنائي الطولي، ثم تبدأ هجرتها إلى المري والأجزاء الفموية للحشرة ولا تغزو مطلقا الغدد اللعابية، وفي اليوم السابع تتراكم في بلعوم الفاصدة مشكلة حاجزا يعيق امتصاص الدم وبلدغ الحشرة الحاملة للطفيلي لثوي جديد تخرج السوطيات بقيئها فتدخل إلى البشرة حيث تهاجم من قبل البالعات الكبيرة macrophage لتتحول بعد 24 ساعة إلى أشكال لاسوطية تتكاثر بالانشطار الثنائي حتى امتلاء البالعات بها ثم تنفجر فتتحرر اللاسوطيات التي تخمج خلايا جديدة في الجلد أو الأعضاء الداخلية (الشكل 4).



الشكل (4) يوضح دورة حياة طفيلي الليشمانية (13).

1-1-5- العامل الناقل Vector:

إن العامل الناقل لداء الليشمانيات هو حشرة من رتبة ثنائيات الأجنحة diptera، عائلة فراشيات المظهر psychodidae التي تحتوي على جنس واحد يعرف باسم الفواصد phlebotomus في العالم القديم واللوتزومية Lutzomyia في العالم الحديث، وتتصف الفاصدة أن جسمها مغطى بأشعار وأشواك ويتألف من رأس وصدر وبطن وتقيس من 2-4 ملم وهي صفراء اللون، يشكل الرأس زاوية 45 درجة مع محور الصدر (8).



الشكل (5) ذبابة الرمل (الفاصدة).

يحمل الرأس زوجا من العيون المركبة، وأجزاء فموية متناسبة مع وظيفتها الثاقبة الماصة، وزوجا من قرون الاستشعار تتوضع أمام العينين، يغطي الرأس أشعارا قصيرة، ويحمل الصدر ثلاثة أزواج من القوائم الطويلة، و زوجا من الأجنحة الورقية الشكل، يغطي البطن أشعار وينتهي عند الذكر بجهاز الإلقام المميز الذي يستخدم في تصنيف الأنواع أما عند الأنثى فينتهي البطن بزائدتين لوضع البيض (8).

تأخذ الحشرة أشكالا مختلفة حسب تطور مراحل حياتها من بيضة إلى يرقة إلى حوراء وصولا إلى الحشرة الكاملة، وتنتشر الفواصد ابتداء من المناطق الرطبة وحتى المناطق الصحراوية، وتكون الإناث فقط ناقلة للمرض و ماصة للدم الذي تحتاجه من أجل تطور البيوض، كما تبقى الإناث الحاملة للطفيلي معدية طوال فترة حياتها وهي حوالي ثلاثة أسابيع، وتكون فعاليتها محصورة في أماكن تناسلها وكقاعدة فإن الفاصدة لا يمكن أن تصل إلى الطوابق العلوية، لذا تشكل غرف النوم الواقعة على مستوى الأرض أماكن شائعة للإصابة.

توصف الفاصدة بأنها ليلية النشاط إذ تنشط ليلا و تختبئ نهارا، وتعرف بالشيخ الساكت لانعدام الطنين أثناء طيرانها (8)، وتكون لدغتها مؤلمة جدا لدرجة أنها توقظ النائم لتختفي بعد أخذ وجبتها الدموية في الزوايا الرطبة والمظلمة والهادئة في المنازل أو في حفر الأشجار وجذوعها

وفي شقوق وتصدعات الجدران وفي حظائر الحيوانات وأخمام الدجاج وأكوام الحجارة والقمامة (10).

هذا ويختلف نوع الناقل تبعا لنوع الطفيلي (14): ففي العالم القديم تنقل الفاصدة البباتاسية P.papatasi الليشمانية الكبيرة، بينما تنقل الفاصدة السيرجنتية P.sergenti الليشمانية المدارية كما تنقل فضية الأرجل P.argentipes الليشمانية الدونوفانية في الهند.

أما في العالم الجديد فإن الانتقال يتم عبر أنواع تنتمي لجنس اللوتزومية ومنها على سبيل المثال لا الحصر اللوتزومية طويلة اللوامس L.longipalpis ناقل الليشمانية الشاغاسية (14).

1-1-6- مستودع الطفيلي (الخازن)Reservoir:

تعد الليشمانية طفيليات واسعة المثوى، إذ تصيب حيوانات كثيرة (أهلية وبرية) تبعا للمنطقة الجغرافية ونوع الليشمانية، هذا ويعتبر الإنسان المستودع الرئيسي لليشمانية المدارية، بينما تمثل القوارض Rodents ومنها فأر الرمل البدين psammomys obesus مستودع الليشمانية الكبيرة في الشرق الأوسط، أما الكلاب فهي المستودع الرئيسي لليشمانية الطفلية والشاغاسية، كما يعتبر الزلم الـ hyrax خازنا لليشمانية الأثيوبية بينما قرد الكسلان sloth مستودع الليشمانية الغويانية والبانامية، هذا وتلعب قوارض الغابة المختلفة دور المستودع بالنسبة لمجموعة الليشمانية المكسيكية (12).

1-1-7- السراية Transmission:

إن وجود الليشمانية يعتمد على عدة عوامل بيئية وحيوية، وبما أن لكل نوع من الليشمانية له ناقله ومستودعه الخاصين به فإن وجود الليشمانية واستمرار دورة حياة الطفيلي يتطلب وجود الناقل بالقرب من المستودع والشروط المناسبة لحياة كل منهما.

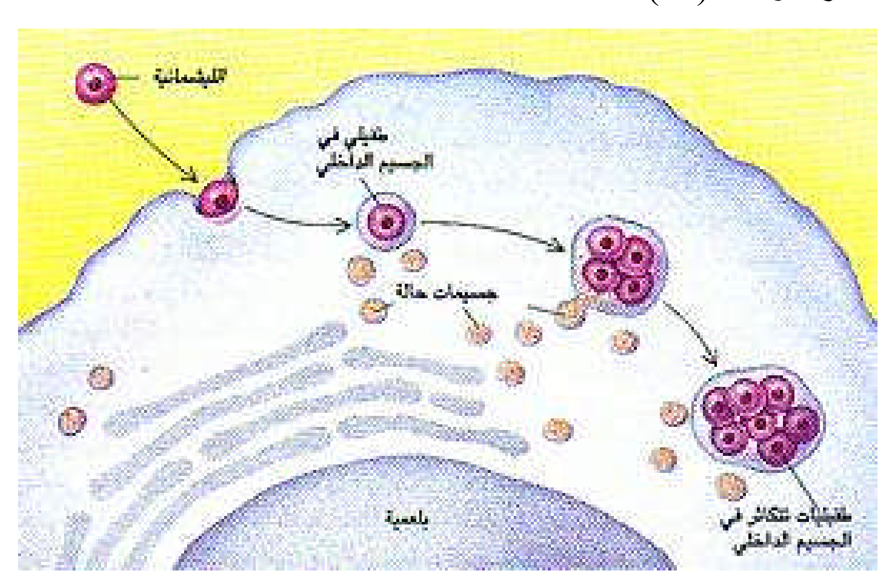
إن طريق الانتقال الرئيسي لداء الليشمانية للإنسان هو عبر لدغ أنثى الفاصدة أو اللوتزومية له، وطالما بقيت الطفيليات موجودة في جسم الثوي (حتى لو كان الخمج تحت سريريا) فإنه يعتبر مصدرا للخمج، ولكن التماس المنزلي مع الإنسان المصاب لا يعتبر مصدرا للعدوى (وكذلك التماس مع الحيوان المصاب).

والجدير بالذكر أن أنثى الفاصدة لاتغدو قادرة على الإخماج (معدية) بمجرد لدغ الثوي المصاب، بل عادة ما يتم ذلك في الأسبوع 1-3 بعد اللدغ، كما أن الحشرة لا تستطيع الوصول إلى الأدمة فوق الثياب، ولذا تتوضع الإصابة عادة على المناطق المكشوفة (15)، نذكر أيضا أن لدغ الحشرة المخموجة للإنسان لا يعني بالضرورة تطور الإصابة لديه، ويتأثر ذلك بعدة عوامل منها عدد الطفيليات المحقونة وفوعة هذه الطفيليات والحالة المناعية للثوي ووجود أمراض مستبطنة

لديه وتركيب لعاب العامل الناقل، إذ تبين أن لعاب الفاصدة المحقون مع الطفيلي يمكن أن يزيد من فوعة هذا الأخير بسبب احتوائه على مواد موسعة للأوعية، كما قد أظهرت الدراسات على الحيوانات أن لعاب الحشرة يملك تأثيرا معدلا للمناعة قد يؤخر الاستجابة الوقائية الحامية المتواسطة بالخلايا (16).

8-1-1- الإمراضية Pathogenesis:

عندما تلدغ الفاصدة جلد الإنسان يدخل مع قيئها إلى الأدمة حوالي 10-200 طفيلي بالشكل المسوط ويموت كثير من هذه الطفيليات الحرة عبر تدميرها بواسطة كثيرات النوى والمتممة، بينما تلتصق الطفيليات الناجية إلى مستقبلات على سطح البالعات الأدمية وتتم بلعمتها لتتحول بعد ذلك إلى الشكل عديم السوط، ويستطيع هذا الشكل مقاومة البيئة الحامضية وتأثير الإنزيمات الحالة الموجودة في الجسيم الحال البلعمي phagolysome التي يقبع ويتكاثر فيها إلى أن تمتلئ الخلايا البالعة (الشكل 6)، فتنفجر ويتحرر الطفيلي للوسط خارج الخلوي وتبقى فيه لفترة إلى أن تبتلعه بالعة أخرى وهكذا (17).



الشكل (6) يوضح دخول وتكاثر طفيليات الليشمانية غير المسوطة في الجسيم الحال الداخلي (18).

إن انتشار الطفيلي من مكان التطعيم يعتمد بشكل رئيسي على نوع الليشمانية: فالليشمانية الدونوفانية والطفلية مثلا تنتشر إلى منظومة البالعات في أماكن أخرى خارج الجلد من الجهاز الشبكي البطاني وتحديدا إلى الكبد والطحال ونقي العظام منتقلة إلى هذه الأعضاء عبر الدوران الدموي واللمفي، محدثة ضخامات حشوية وفقر دم وفي حال نجاة المريض يمكن لليشمانية الدونوفانية في بعض الحالات أن تعود مجددا إلى منظومة البالعات الجلدية محدثة داء الليشمانية الجلدية التالي للكلاآزارPKDL Post-Kalaazar dermal leishmaniasis، حيث يمكن أن

تبقى هناك لسنوات (19)، بينما تبدي الليشمانية البرازيلية ميلا خاصا للانتحاء نحو النسج المخاطية الهوائية الهضمية للأنف والبلعوم محدثا ما يعرف بالليشمانية المخاطية، في حين أن الليشمانية الكبيرة ومجموعة الليشمانية المكسيكية تبقى محدودة في مكان دخولها مع إمكان امتداد موضعي أو إلى العقد اللمفاوية النازحة للمنطقة محدثة ضخامة عقدية مرافقة لداء الليشمانيات الجلدي في بعض الحالات .

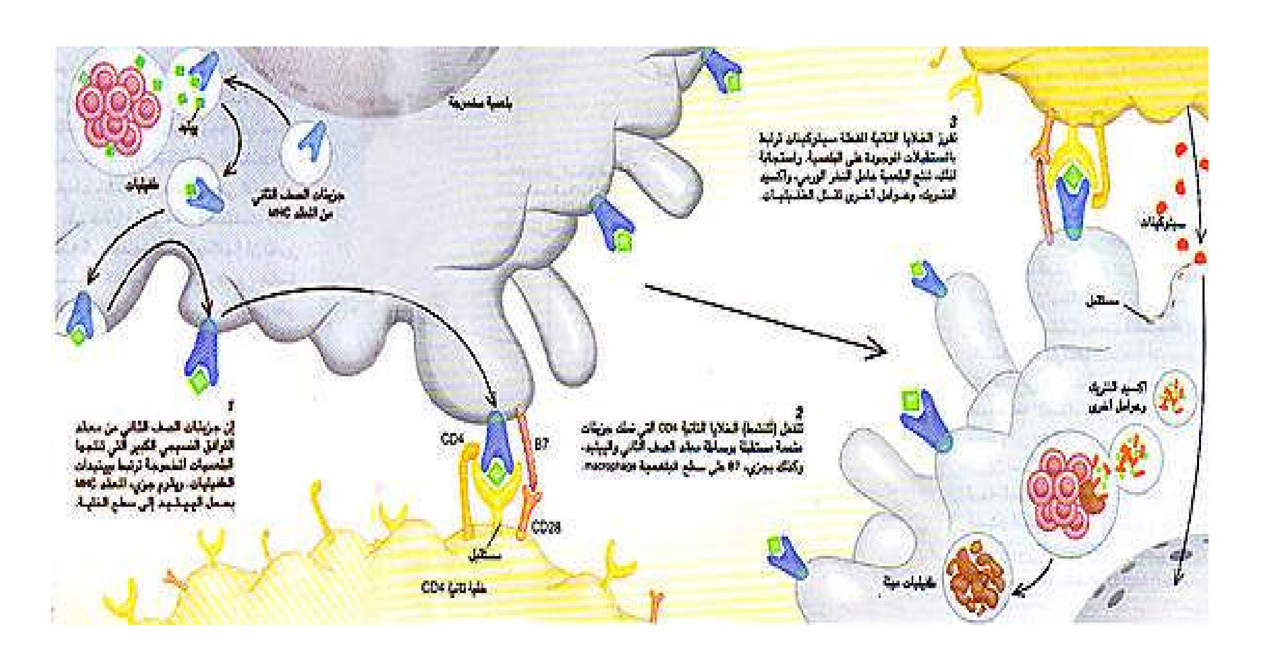
إذا فالنموذج السريري لداء الليشمانيات يتحدد وبالدرجة الأولى بناء على نوع الطفيلي، بل وأكثر من ذلك قد يتعلق الأمر أيضا بالسلالة التي ينتمي إليها، فبعض سلالات الليشمانية الطفلية تملك انحيازا جلديا محدثة ليشمانية جلدية، وبعض سلالات الليشمانية المدارية تملك انحيازا حشويا محدثة ما يعرف بداء الليشمانية المنحازة حشويا الذي ظهر عند الجنود الأمريكيين أثناء عملية عاصفة الصحراء في حرب الخليج عام 1990 (20).

إلا أن عوامل أخرى أيضا يمكن أن تساهم في تحديد شكل الإصابة السريرية عدا عن نوع الطفيلي وسلالته ومنها مكان التطعيم (21)، الحالة الغذائية للثوي (فأكثر إصابات الليشمانية الحشوية تشاهد عند الأطفال المصابين بسوء تغذية) (22) إضافة إلى الحالة المناعية والجينية للثوي (23).

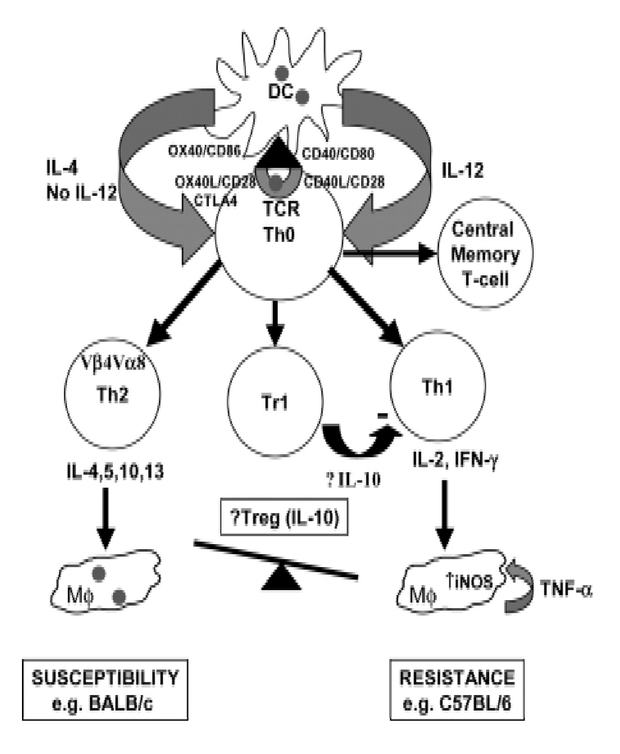
1-1-9- المناعة Immunity:

بعد تلقيح الفاصدة للثوي بالشكل المسوط يموت كثير من هذه الطفيليات الحرة عبر تدميرها بواسطة كثيرات النوى والمتممة، حيث أن الأشكال أمامية السوط لكل أنواع الليشمانية تفعل المتممة والذي يقود غالبا إلى انحلال الطفيلي أو تسريع تمثله (قبطه) من قبل البالعات، وهذا يشير إلى الدور الهام للمتممة كأحد دفاعات الثوي ضد الطفيلي (24)، ويمكن أن يتم تفعيل المتممة بالسبيل الكلاسيكي في حال تواجد أضداد (25)، أوالسبيل البديل (26)، كما يمكن تفعيلها أيضا عبر سبيل اللكتين بواسطة البروتين الرابط للمانوز(Manose Binding (MBL Lectin (27)، حيث يلعب الأخير دورا طاهيا وذلك من خلال توسطه لتثبيت الطفيلي على الكريات البيض، فهو يرتبط بعديدات السكريد المنتهية بالمانوز الموجودة في الليبوفوسفوغليكان فيحرض البلعمة من جهة ويحرض شلال المتممة من جهة أخرى، هذا وإن ارتباط الـMBL إلى سطح الليشمانية يقدم دليلا آخر على الآلية الإضافية لتشكيل الـ C3b الذي يشارك في الالتصاق بالبالعات، كما يوجد أيضا عوامل مصلية أخرى غير MBL تضمن تمثل الليشمانية من قبل الكريات البيض مفصصة النوى (28)، وهكذا فإن ما ينجو من الانحلال من الأشكال أمامية السوط يدخل إلى البالعات متحولة إلى الشكل اللاسوطي ويسكن في فجوات داخل الخلايا البالعة

كما تدخل جزيئات معقد التوافق النسيجي الكبير Major Histocompatibility Complex (MHC) من الصنف الثاني الفجوات التي تحوي المستضدات الليشمانية وتغدو جزيئات المعقد MHC محملة بالببتيدات التي تطلقها الطفيليات أو التي تنشطر عنها بالأنزيمات حالة البروتين وتنطلق بها نحو الغشاء الخارجي للبلاعم لتتعرف اللمفاوية التائية المساعدة CD4 عليها كمستضدات ممرضة عن طريق ارتباط مستقبلات الخلايا التائية T cell receptor (TCR) مع جزيئات المعقد MHC– المرتبطة ببتيدات الليشمانية، تتطور حادثة التعرف هذه نحو استجابة مناعية فإذا أظهرت الخلية البلعمية جزيء B7 على سطحها يتعرف الأخير على بروتين منفصل هو CD28 الموجود على سطح الخلايا التائية (الشكل 7)، وحينما تستقبل الخلية التائية المساعدة الإشارة المزدوجة فإنها تطلق السيتوكينات وأهمها الانترفيرون غاما IFN-γ حيث يلعب الأخير دورا هاما في الشفاء والحماية طويلة الأمد ويصنف تحت قائمة سيتوكينات T helper 1(Th1) التي تضم أيضا الانترلوكين 2 (IL-2) وعامل نخرة الأورام TNFα (الشكلين 8و9) وتتحرض استجابة Th1هذه بفضل الـ IL-12 الذي يتم إنتاجه من قبل البالعات (29)، ومما يدل على الدور الفعال للاستجابة من النمط Th1 في المقاومة المناعية لليشمانية هو مقاومة سلالات الفئران C57BL/6 التي تنتج استجابة من النمط Th1 لطفيلي الليشمانية، وعلى العكس عجزت سلالات الفئران BALB/c التي تنتج استجابة من النمط Th2 أي التي تترافق بإنتاج السيتوكينات IL-4,IL-5,IL-13(30،31) عن مقاومة الليشمانية، حيث ينتشر الطفيلي في عضويتها مؤديا إلى موتها.

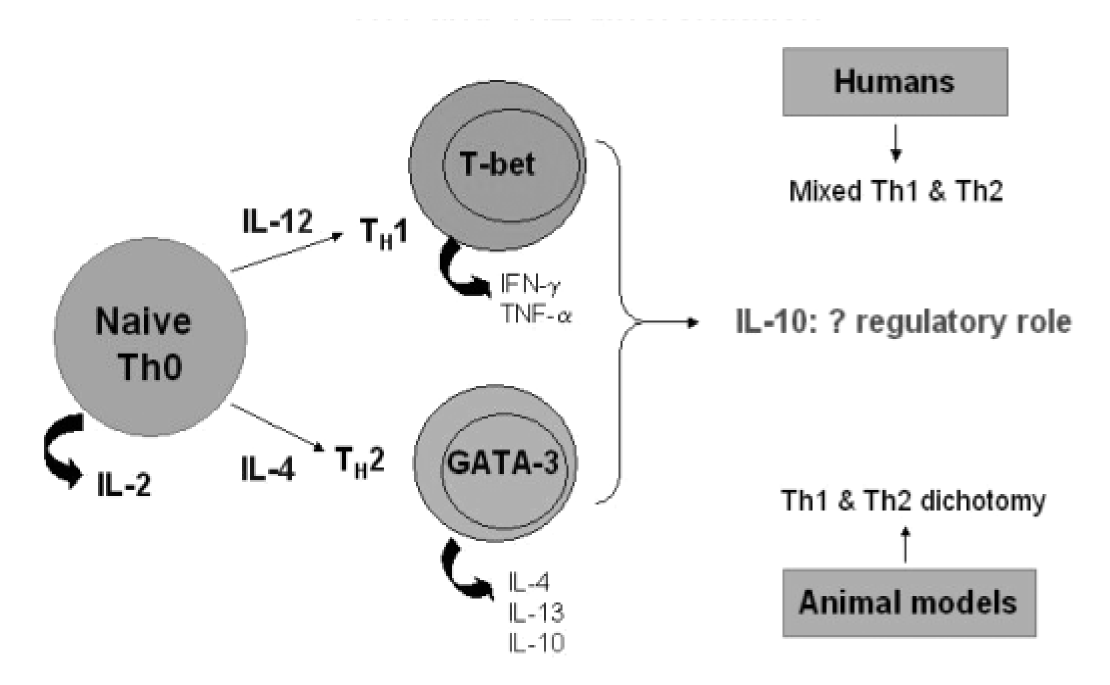


الشكل (7) كيف يتعامل الجهاز المناعي مع طفيليات الليشمانية(18).



الشكل (8) نموذج عن الجواب المناعي عند الفئران الحساسة والمقاومة لليشمانية الجلدية (31).

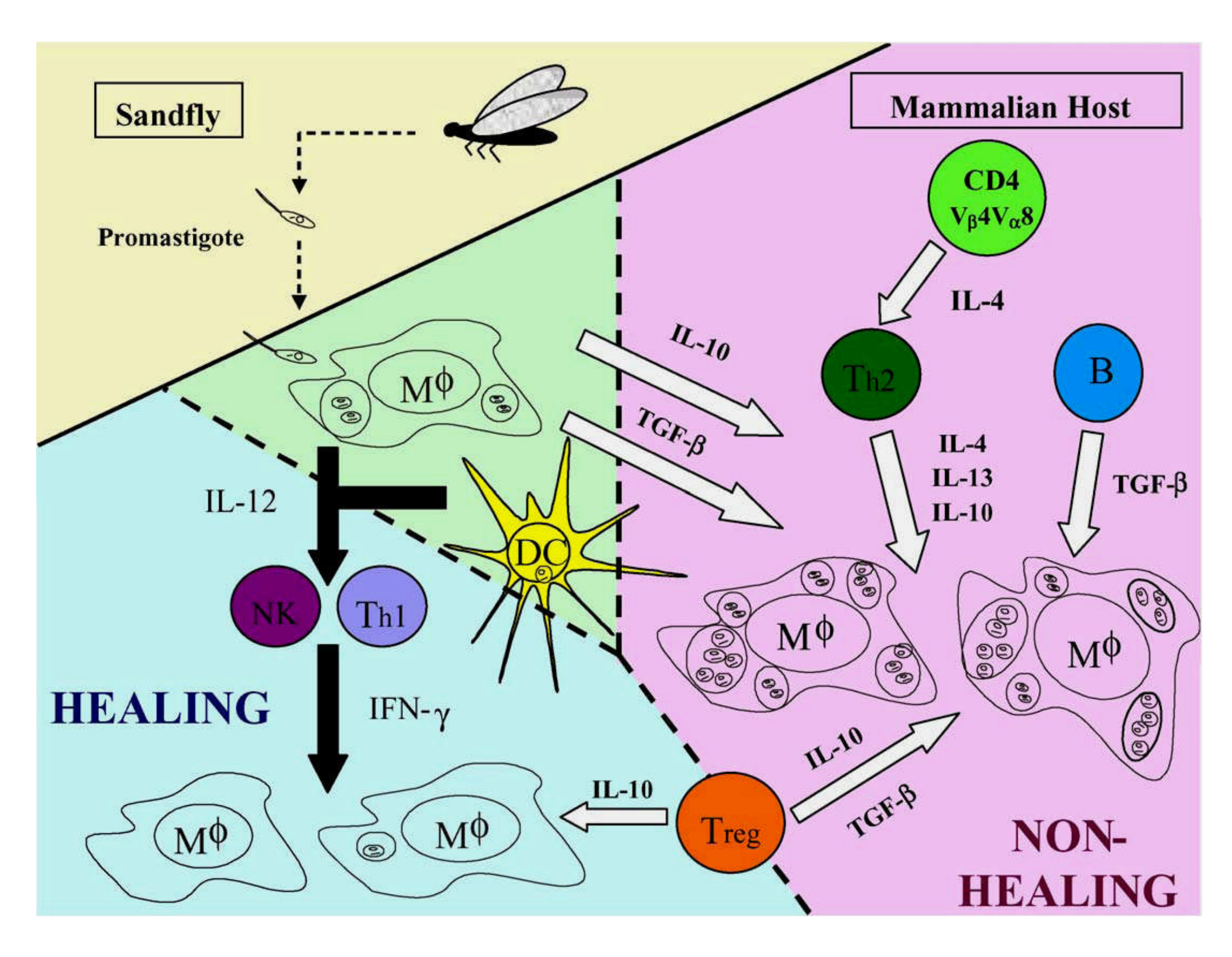
أما عند الإنسان فإن هذه القطبية في الاستجابة المناعية وعلاقتها بسير المرض تكون أقل وضوحا، إذ أن الدراسات على الليشمانية الجلدية وجدت مزيجا من سيتوكينات Th1و Th2 معا (الشكل9) دون إمكانية ربط ذلك بالشفاء، غير أن الأشخاص الذين شفوا من خمج الليشمانية الكبيرة وتطورت لديهم مناعة خلوية ضدها يقومون بإنتاج كميات كبيرة من TNFαوIFNγ (أي يبدون استجابة Th1) عند تحدي التائيات بمستضدات الليشمانية أكبر من تلك المشاهدة عند من لم تسبق لهم الإصابة بها (من ليس لديهم مناعة) مما يشير إلى دور محتمل لـTh1 في مقاومة المرض عند الإنسان أيضا (32،33) (الشكل 10).



الشكل (9) الجواب المناعي Th1,Th2 في الليشمانية (33).

إن البالعات لاتستطيع قتل الليشمانية والتخلص منها بمفردها بعد أن تقوم ببلعمتها، حيث تحتاج إلى تضافر تأثير السيتوكينات المفرزة من Th1 وتحديدا TNFα وIFNγ لتقوم نتيجة تنبيهها بهذه السيتوكينات بتركيب أول أكسيد الأزوت NO ذو القدرة القاتلة لطفيليات الليشمانية مما يفسر دور هذه السيتوكينات في مقاومة الليشمانية (34)، وبالمقابل فإن السيتوكين IL-10 (الذي تفرزه خلايا عدة منها البالعات والتائيات المساعدة) يثبط إنتاج سيتوكينات Th1 ويثبط أيضا التعبير عن أنزيم NO سينتيتاز معززا بذلك بقاء وتطور الخمج (35،36).

إن المرضى المصابين بانهيار في المناعة الخلوية (كمرضى الايدز) يبدون زيادة في نسبة تطور خمج سريري بالليشمانية الحشوية مقارنة بالأسوياء مناعيا، كما يمن أن تتطور لديهم أشكالا شاذة من الإصابة بالليشمانية سواء الجلدية منها أو الحشوية، إضافة إلى ذلك كثيرا ما تكون الاختبارات المصلية (لتحري أضداد الليشمانية) لديهم سلبية، ومعدلات النكس والوفيات عالية، كما أن الاستجابة على العلاج تكون أدنى عادة (37)، وكل ذلك يدعم الدور الذي تلعبه المناعة الخ الخلوية في مقاومة المرض. الخلوية في مقاومة المرض.



الشكل (10) الجواب المناعي في حالة الشفاء وعدم الشفاء من الليشمانية الكبيرة عند الثديات (38).

إن المناعة الخلطية تتطور أيضا أثناء سير المرض، وتتشكل أضدادا نوعية للطفيلي في داء الليشمانية الحشوية وينجم عن ذلك ارتفاع ملحوظ ومميز في عيار الغلوبولينات المناعية، لكن هذه الأضداد لا تستطيع تخليص الجسم من هذه الطفيليات غير أن ثمة فائدة تشخيصية لهذه الأضداد: إذ تستخدم طرق معايرتها في تحري إصابة الثوي بالليشمانية، بينما يتم تحري الاستجابة المناعية الخلوية الناجمة عن الإصابة بالطفيلي بواسطة الاختبار الجلدي (تفاعل مونتينغرو) (39).

1-1-10- التظاهرات السريرية لأدواء الليشمانية Clinical manifestations:

تنجم الأشكال السريرية الثلاثة من الليشمانية (الجلدية والجلدية المخاطية والحشوية) عن طيف واسع من أنواع الليشمانية، وعلى الرغم من وجود علاقة قوية بين النوع المسبب والشكل السريري لكن عوامل أخرى قد تتدخل منها الصفات المميزة للسلالات ،والكفاءة المناعية للثوي، وكذلك الحالة الجينية له فالأنواع النموذجية لليشمانية الجلدية قد تسبب حشوية أيضا والعكس صحيح (40).

1-1-10-1- الليشمانية الجلدية cutaneous leishmaniasis: وتأخذ الأشكال التالية:

1-1-10-1-1- الشكل القرحي (الرطب) wet ulcer: يبدأ المرض على شكل حطاطة حمامية تكبر تدريجيا على مدى عدة أسابيع لتصل لقطر 2سم أو أكثر مع اكتسابها مسحة بنفسجية وتظهر عليها جلبة مركزية إذا تم نزع هذه الجلبة تشاهد تحتها قرحة ضحلة ذات حواف مرتفعة وقاسية نوعا ما، تستمر هذه العقيدة المتجلبة في النمو على مدى 2-3 أشهر وقد تصل إلى قطر 3-6 سم أو أكثر، كما قد تظهر حطاطات تابعة صغيرة في محيط الآفة، وفي حالات نادرة قد تمتد الآفة عميقا لتصل حتى الشحم تحت الجلد، كما قد تتضخم العقد اللمفية المنطقية، بعد ذلك تستقر الآفة وتحافظ على حجم ثابت تقريبا لمدة 3-6 أشهر أخرى، لتبدأ بعدها بالالتئام تاركة في النهاية ندبة منخفضة قليلا، أكثر ما يشاهد هذا الشكل في المناطق الريفية ومستودعه الرئيسي هو القوارض وعادة ما ينجم عن الإصابة بالليشمانية الكبيرة، كما قد يشاهد نادرا في الآفات الجلدية المحدثة ببعض سلالات الليشمانية الطفلية (41).

1-1-10-1-2- الشكل الدملي الجاف Dry ulcer: يظهر المرض على شكل حطاطة ثم تتطور إلى عقيدة صغيرة مائلة للبني، تكبر ببطء لتصل إلى قطر 1-2 سم على مدة 6 أشهر، وفي هذه المرحلة تتشكل قرحة ضحلة في المركز تتغطى بجلبة شديدة الالتصاق، تتميز بأنها غير مؤلمة، وغير ملتهبة، ولا تترافق بضخامة العقد اللمفاوية المجاورة إلا إذا أصيبت بإنتان ثانوي، تستمر الآفة حوالي 8-12 شهر، تبدأ بعدها بالتراجع تاركة مكانها ندبة في نهاية المطاف (8).

إن ديمومة هذا الشكل أطول بمرتين من ديمومة الشكل السابق، ويمكن أن ينكس بعد شفائه الظاهري بعدة سنوات (محدثا الليشمانية الذئبانية)، أكثر ما يرى هذا الشكل في المدن ومستودعه الرئيسي هو الإنسان وعادة ما ينجم عن الليشمانية المدارية tropica (41).

1-1-10-1-3- الليشمانية الجلدية الناكسة، الليشمانية المزمنة، الليشمانية الذئبانية L.recidivans, L chronic, L.lupoid

تظهر هنا حطاطات حمراء أو صفراء بنية بالقرب من ندبة آفة سابقة أو على الندبة نفسها، تتلاقى هذه الحطاطات مشكلة لويحة بقطر عدة سنتيمترات مع شفاء مركزي مندب وحواف فعالة أخذة بالامتداد المحيطي معطية أشكالا ملتفة أوحلقية تشبه الذأب الشائع. أكثر ما تترافق هذه الآفة مع الشكل المديني الناجم عن الليشمانية المدارية L.tropica (11)

مع أن الليشمانية الذئبانية غير مخربة بدرجة الذأب الشائع، إلا أنها قد تستمر وتنتشر ببطء لسنوات عديدة، ميز بعض الباحثين بين الليشمانية الناكسة والليشمانية الذئبانية أو المزمنة وقالوا أن الأولى تحدث بعد شفاء ظاهري للآفة البدئية أما حاليا تعتبر الآفتين متطابقتين (42).

1-1-10-1-4- قرحة شيكلرو Chiclero ulcer: وهي شكل جديد من الليشمانية الجلدية القرحية يصيب صيوان الأذن، وبخلاف الشكل القرحي النموذجي، فإن قرحة شيكلرو لا تشفى عفويا خلال عدة أشهر بل تتحول إلى ليشمانية مزمنة تستمر لسنوات محدثة تدميرا وتشويها في غضروف صيوان الأذن، يشاهد هذا الشكل في أمريكا الوسطى وينجم عن الإصابة بالليشمانية المكسيكية المكسيكية (41).

1-1-10-1-5- داء أوتا uta: وهو شكل خاص من الليشمانية الجلدية، يتميز بأفات متعددة صغيرة تشفى عفويا، وميزة هذا الشكل هي حدوثه في مناطق مرتفعة جدا عن سطح البحر مقارنة بباقي أنواع الليشمانية، حيث يصادف هذا الشكل في جبال الأنديز في البيرو والأرجنتين، وينجم عن الإصابة بالليشمانية البيروفية ومستودعها هو الكلاب.

1-1-10-1-6- الليشمانية الجلدية المنتشرة Disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL)

يبدأ المرض بعقيدة مفردة تنتشر موضعيا معطية آفات تابعة متعددة ولاحقا تعطي نقائل جلدية بعيدة تمتد على مساحات واسعة من سطح الجسم تمتاز باحتوائها عدد كبير من الطفيليات ولكنها لا تتقرح ولا تعطي انتشارا للأحشاء، وإنما تستمر بإزمانها لسنوات عديدة دون حدوث شفاء عفوي وتشبه الصورة السريرية الجذام الجذمومي، يعزى المرض إلى خلل في دفاعات الثوي تجاه أنواع معينة من الليشمانية حيث يكون اختبار الليشمانيين سلبيا (40)، ويكثر حدوثه عند مضعفي المناعة وبشكل خاص مرضى الايدز (40)، العامل المسبب لهذا الشكل من الإصابة في العالم القديم هو الليشمانية الأثيوبية وخازنها الزلم، وفي العالم الجديد هو الليشمانية الأمازونية (من مجموعة الليشمانية المكسيكية) ومستودعها هو قوارض الغابة.

1-1-10-1-7- أشكال أخرى من الليشمانية الجلدية:

أكتشف حديثا وجود أشكال سريرية جديدة غير وصفية للمرض كالشكل الداحسي الحاد، والشكل المواتي، والحلقي، والراحي الأخمصي (43) والطفح الشبيه بالأكزيما (44) والليشمانية الشبيهة بالحمرة التي تظهر بشكل بقع ولويحات متصلبة حمامية على الوجه والأنف تشبه الحمرة (45)، سبب هذه الأشكال غير معروف ويمكن الشك بدور السلالات الطفيلية المسببة وبالاستجابة المناعية للمضيف (43،45).

1-1-10-2- الليشمانية الجلدية المخاطية Mucutaneous Leishmaniasis (MCL):

وتدعى أيضا الاسبونديا Espundia، وهي إصابة مزمنة وخطيرة تظهر بعد فترة قد تمتد لسنوات من الإصابة الجلدية، حيث تصاب المخاطية الأنفية وقد تظهر الإصابة أيضا في البلعوم و الحنك والحنجرة أو الشفى العلوية، تكون الآفة البدئية عبارة عن عقيدة تظهر على القرين

السفلي أو الحاجز الأنفي، تترافق بأعراض زكام أو رعاف نتيجة الوذمة والالتهاب (40)، تستمر الإصابة سنوات عديدة مؤدية إلى تدمير نسيجي واسع يتخرب فيها حاجز الأنف، ويمكن للتخريب أن يمتد إلى الحنك والشفاه أو إلى السبيل التنفسي العلوي محدثا صعوبات في التكلم وتناول الطعام والتنفس فضلا عن التشوه الشكلي الشديد، ويمكن أن يموت المريض بسبب خمج ثانوي أو بسبب سوء التغذية أو القصور التنفسي (40).

ينجم هذا الشكل من الإصابة عن مجموعة الليشمانية البرازيلية خاصة البرازيلية البرازيلية التي يعتقد أن مستودعها هو القوارض (40).

1-1-10-3- الليشمانية الحشوية Visceral leishmaniasis:

وتسمى أيضا الكلاآزار أي الحمى السوداء، وهي الشكل الأكثر خطورة بين أدواء الليشمانية. ينجم هذا الداء في الهند والسودان عن الليشمانية الدونوفانية ذات المستودع الانساني، أما في دول حوض البحر الأبيض المتوسط فينجم عن الليشمانية الطفلية وفي دول أمريكا اللاتينية عن الليشمانية الشاغازية وكلاهما ذو مستودع حيواني (الكلاب والثعالب).

يمر المرض سريريا بعدة مراحل من مرحلة الحضانة التي تمتد بين 3-6 أشهر ثم مرحلة الغزو (الأعراض السريرية) وتظهر فيها بشكل أساسي الحمى وضخامة الطحال وفقر الدم وقد يحدث ضخامة كبدية والتهاب بسيط في عدد من العقد اللمفاوية، كما تظهر تصبغات جلدية داكنة سوداء خاصة على الوجه واليدين والقدمين وهذا ما دعا إلى تسمية المرض بالكلاآزار أي الداء الأسود.

أهم اختلاطات الداء الحشوي هو المتلازمة النفروزية، وفي حالات نادرة إصابات على مستوى الجهاز العصبي المركزي، المرض مميت خلال سنتين ما لم يعالج وقد تحدث إنتانات مرافقة كالسل وذات الرئة وتكون مميتة أيضا.وقد يتطور ما يسمى **بالليشمانية الجلدية التالية للكلاآزار** PKDL وتظهر بعد الشفاء بـ1-2 سنة ويبدأ ببقع ناقصة الصباغ تشبه الجذام الجذمومي، تتطور مع الزمن عقيدات وحطاطات مكان هذه البقع على الوجه والذقن والإذنين وعلى السطوح الباسطة للذراعين والساقين والاليتين، يستمر المرض سنوات عديدة ولا يحدث تراجع عفوي للمرض ولكن لا تشاهد إصابة حشوية، والعامل المسبب هنا هو الليشمانية الدونوفانية.

تكون نسبة حدوث PKDL 20% من مرضى الليشمانية الحشوية في الهند، و5% في شرق افريقيا ويكون ظهوره هنا أسرع من الشكل الهندي حيث يتطور المرض أثناء فترة النقاهة (40).

هناك شكل نادر من الليشمانية الحشوية سجل عند بعض الجنود الأمريكيين أثناء حرب الخليج الأولى وتميز بالوهن والإسهال المتقطع والحمى والسعال دون أن يترافق بالتظاهرات الوصفية

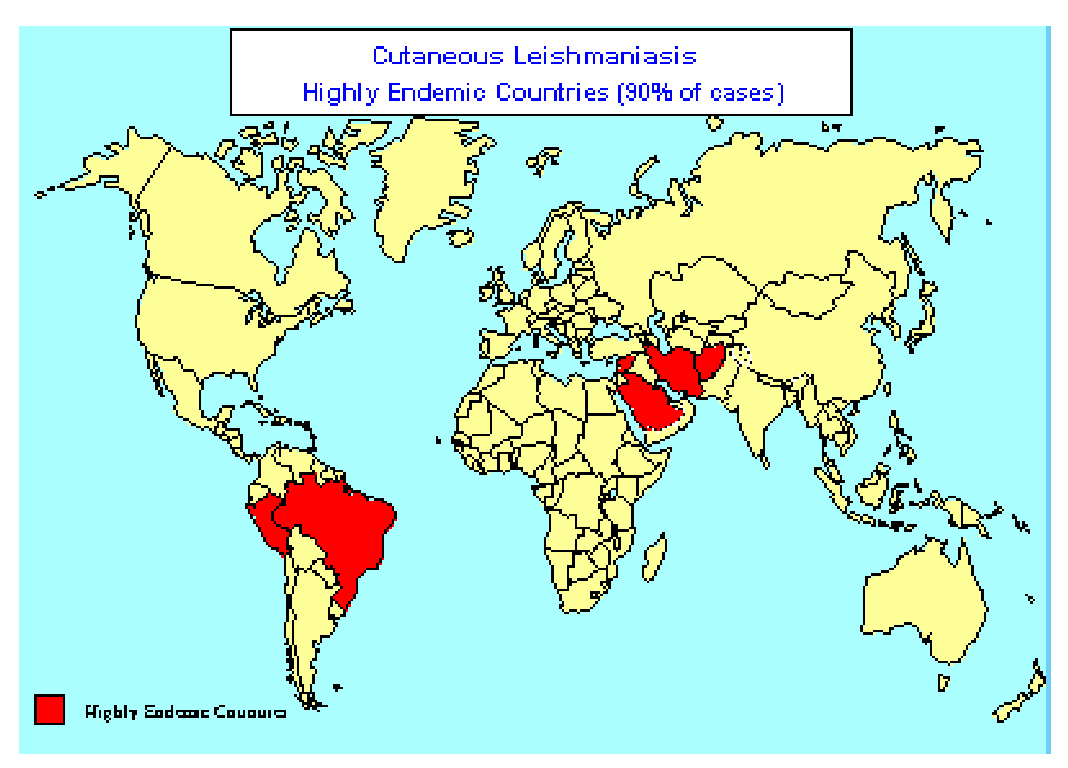
لليشمانية الحشوية ودون آفة جلدية مرافقة دعي المرض بالليشمانية المنحازة حشويا viscerotropic وينجم عن الليشمانية المدارية (20).

11-1-1- الوبائيات Epidemiology:

إن لأدواء الليشمانية بأشكالها السريرية الثلاثة انتشارا عالميا واسعا، فهناك حوالي 12 مليون مصاب بالمرض و350 مليون شخص معرض للإصابة، وذلك في 88 بلدا حول العالم يتوطن فيها المرض Who (2)، ويقدر معدل الوقوع السنوي بـ 1-1.5 مليون إصابة من الليشمانية الجلدية و0.5 مليون إصابة من الليشمانية الحشوية، وما تزال نسبة الحدوث العالمية في ارتفاع، كما أنه قد حدثت بؤر جديدة لاستيطان المرض خلال العقود الأخيرة وكان من الصعب ضبط الجائحات أيضا، هذا و يعزى الارتفاع الحاد في عدد الحالات المسجلة وزيادة المناطق التي يستوطن فيها المرض إلى الحركة السكانية والهجرة.

أما في الدول الغربية يزداد حدوث الليشمانية بسبب ترافقه مع الايدز والسياحة، ويقدر أنه بين 1.5-9.5% من مرضى الايدز مصابين بالليشمانية (46) .

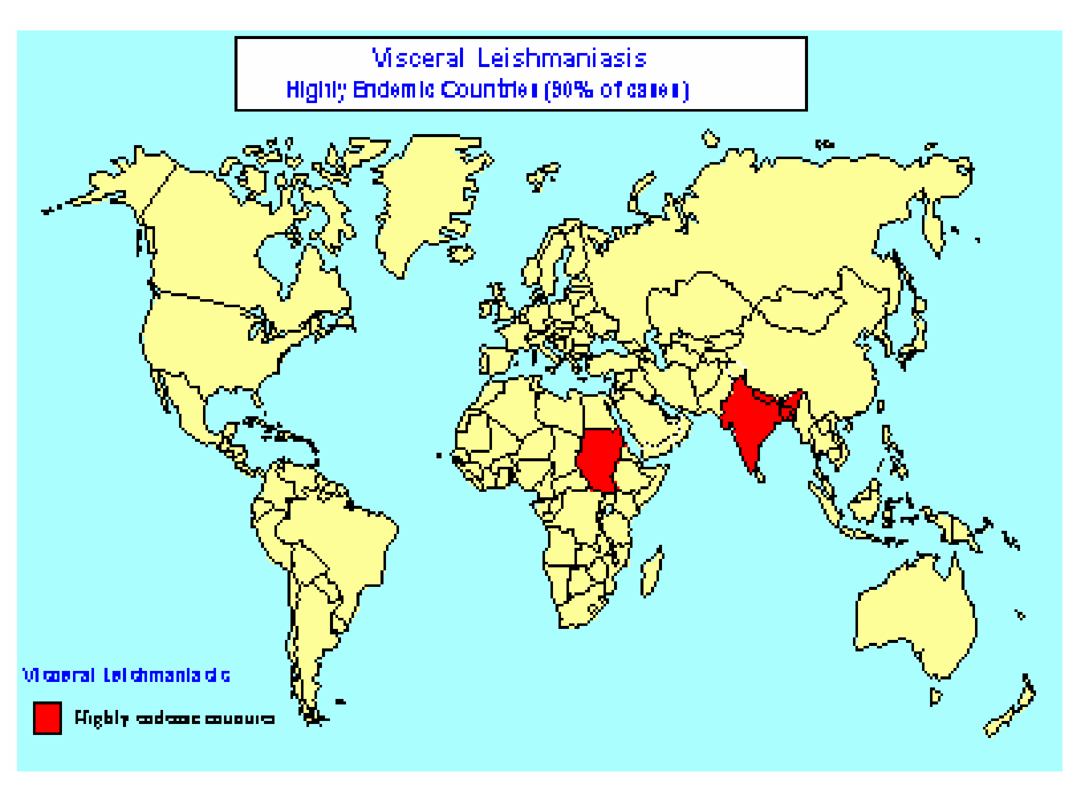
وحسب إحصائيات منظمة الصحة العالمية فإن 90% من حالات الليشمانية الجلدية تحدث في أفغانستان والبرازيل وإيران والبيرو والسعودية وسوريا، ويوجد الشكل الجاف أو المديني في الشرق الأوسط وآسيا الوسطى (سوريا ولبنان وفلسطين والعراق والأردن والسعودية واليمن والمغرب وتركيا وإيران) بالإضافة لجنوب أوروبا والهند وتسببه الليشمانية المدارية وخازنه الرئيسي هو الإنسان (47)، أما الناقل فهو الفاصدة السيرجنتية، بينما ينتشر الشكل الرطب أو الريفي إضافة إلى ما سبق في مناطق شمال أفريقيا وجنوب الهند وفي الشرق الأوسط (باكستان ،إيران، أفغانستان، تركيا، سوريا، الأردن، فلسطين، السعودية، الكويت، تونس، مصر) وتسببه الليشمانية الكبرى التي تتطفل على القوارض وتعد إصابة الإنسان بها صدفة (48) والناقل هو الفاصدة الباباتاسية، في حين تشاهد الليشمانية الأثيوبية في شرق أفريقيا (مرتفعات أثيوبيا وكينيا والسودان) وتنقلها الفاصدة مزرقة الأرجل ph.pedifer والفاصدة طويلة الأرجل ph.longipes



الشكل (11) مناطق توطن الليشمانية الجلدية في العالم.

أما بالنسبة لليشمانية الجلدية المخاطية فإن 90% من الإصابات تحدث في بوليفيا، البرازيل والبيرو يسببها معقد L.braziliensis خاصة نويع البرازيلية البرازيلية L.b. braziliensis المسؤول عن داء اسبونديا، ويكون المستودع هو قوارض الغابة والناقل بعض تحت أنواع جنس اللوتزومية.

تحدث 90% من الليشمانيا الحشوية في بنغلادش و البرازيل و الهند ونيبال والسودان، ويعد معقد الدونوفانية L.donovani complex مسؤولا عن الإصابة بها، فقد وجد أن نويع الليشمانية الدونوفانية الطفلية L.d.infantum يسبب ما يسمى بنمط البحر المتوسط وينتشر في الدول المحيطة بالبحر المتوسط ومنها سوريا وشمال افريقيا (مصر) وجنوب أوروبا وروسيا وكذلك في الصين، ومستودعه حيواني المنشأ (الكلاب والقوارض البرية)، وناقله الفاصدة الوبيلة P.perniciosus و P.ariasi، في حين يكثر نويع الليشمانية الدونوفانية الدونوفانية L.d.donovani المسؤول عن الداء الحشوي ذو النمط الهندي في وسط وشرق افريقيا وفي بعض الدول الآسيوية وبخاصة الهند، ويكون مستودعه انساني أما الناقل فهو الفاصدة فضية الأرجل P.argentipes، أما في أمريكا الجنوبية والوسطى فتنتشر نويع الليشمانية الدونوفانية الشاغاسية L.d.chagasi ومستودعه الكلاب والقوارض وناقله اللوتزومية طويلة اللوامس Lutzomyia longipalpis (40).



الشكل (12) مناطق توطن الليشمانية الحشوية في العالم (2).

1-1-12- واقع الليشمانية في سوريا:

عرف داء الليشمانيات في سوريا بنوعيه الجلدي والحشوي منذ مطلع القرن الماضي (49،50)، وقد سجلت إصابتان بالليشمانية الحشوية عند الأطفال وعند بعض الكلاب في منطقة كسب سنة 1958 (51)، وفي سنة 1965 جمع خبير من منظمة الصحة العالمية معلومات عن الليشمانية في سوريا (52)، وكذلك أجريت دراسة عن وضع الليشمانية الجلدية فيها سنة 1976 (53)، ولكن قبل سنة 1980 كانت الليشمانية الجلدية محصورة في حلب بسبب رش الـ DDT ضد الملاريا (54)، فيما بعد حدثت عدة جائحات محلية شملت أغلب محافظات القطر ويظهر الجدول التالي عدد الحالات المسجلة خلال العشرين سنة الماضية في سوريا.

السنة	**1990**	**1991**	**1992**	**1993**	**1994**	**1995**	**1996**	**1997**	**1998**	**1999**
الليشمانية الحشوية	_	_	_	_	_	15	25	30	44	55
الليشمانية الجلدية	12561	15034	10860	12288	15717	17109	14010	12027	8893	12832
السنة	**2000**	**2001**	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**
الليشمانية الحشوية	37	29	37	36	20	17	4	11	17	16
الليشمانية الجلدية	19837	24839	21560	28881	26878	21950	18741	17709	29140	46348

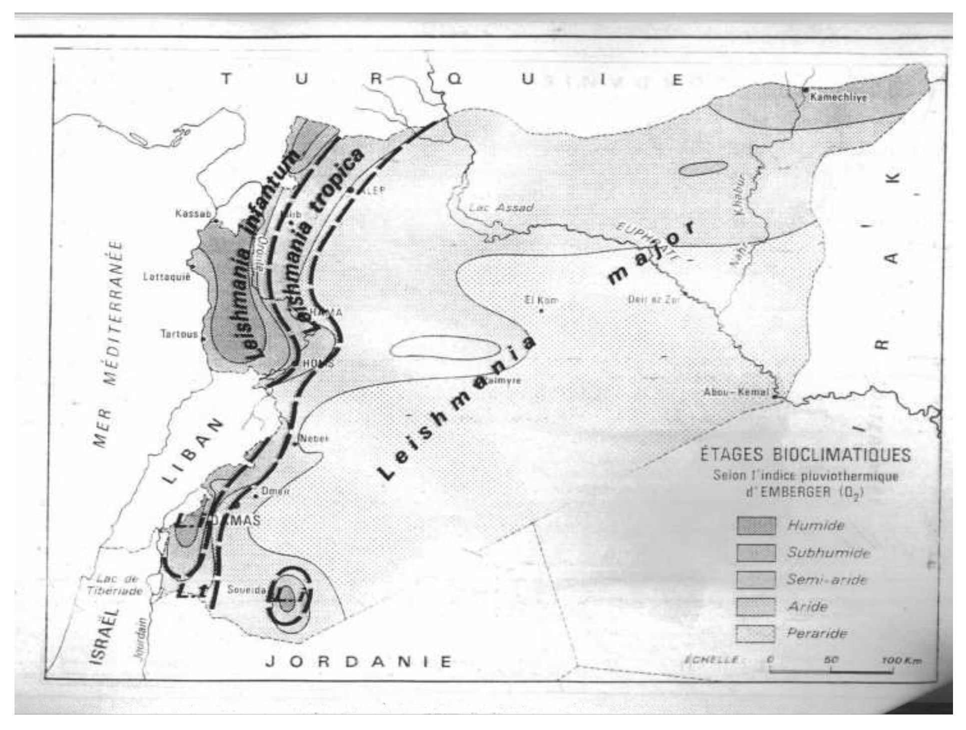
الجدول (2) يوضح عدد حالات الليشمانية المبلغ عنها خلال 20 سنة في سوريا حسب النشرة الإحصائية الصحية الصادرة عن وزارة الصحة في سوريا.

ينجم المرض في سوريا عن ذراري متعددة تم تصنيفها إنزيميا وهي :

1-1-12-1- الليشمانية المدارية L.tropica: وتسمى anthroponotic كون الإنسان هو الخازن الأساسي لها، وتسبب الليشمانية الجلدية الجافة وتشكل 85-90% من الإصابات في سوريا وتتواجد في المناطق نصف الجافة أو شبه الجافة (حلب، ادلب، حماه، اللاذقية، طرطوس، وريف دمشق كمناطق قدسيا ودمر والهامة وجبل قاسيون)، أما العامل الناقل فهو الفاصدة السيرجنتية، والطفيلي المسبب هو L. tropica MON-76 (54).

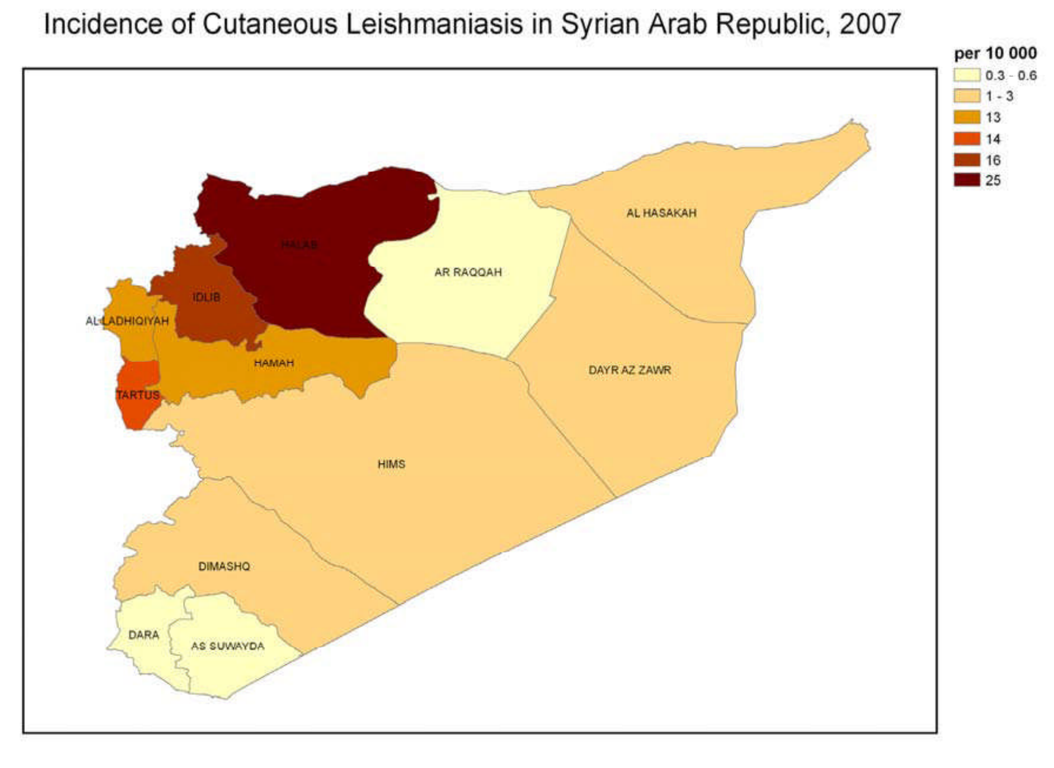
1-1-12-2- الليشمانية الكبيرة L.major: وتسمى zoonotic كون خازنها هو القوارض منها الرمل البدين Psammomys obesus وتتهم أيضا Meriones و.Nesokia indica، أما الآفة الجلدية فهي من نوع الليشمانية الرطبة وتنتشر في المناطق القاحلة والصحراوية (دير الزور وقرى حوض الفرات والبوكمال ودمشق وريفها (النبك، الرحيبة، قارة، دير عطية، الضمير، عدرا، الزبداني) وتشكل 10-15% من الإصابات في سوريا أما العامل الناقل فهو الفاصدة الباباتاسية والطفيلي المسبب هوL.major MON-26 (56،55).

1-1-12-3- الليشمانية الحشوية visceral leishmaniasis: وتوجد في المناطق الرطبة وشبه الرطبة أي في المناطق الساحلية وسلسلة الجبال الساحلية (ادلب، كسب، اللاذقية، درعا) مستودعها: الكلاب الشاردة أما الناقل فهو الـ ph.tobbi. وتسببها MON-1 الطفلية (58،57).



الشكل (13) توزع الليشمانية حسب المناخ في سوريا.

ولابد من الإشارة إلى أن تزايد عدد البلاغات وظهور إصابات جديدة بهذا الداء يعود إلى الهجرة السكانية العشوائية، والتوسع العمراني والزراعي ،وكذلك توفر المناخ والتربة الملائمة لحياة الفاصدة الناقلة والحيوان الخازن، وانعدام شروط الصحة والنظافة، وشبكات الصرف الصحي المكشوفة خاصة في أطراف بعض المدن التي ينتشر فيها السكن العشوائي (حيث تتراكم أكوام القمامة ومخالفات البناء) (59،60).



الشكل (14) يظهر معدل وقوع الليشمانية الجلدية في المحافظات السورية خلال 2007.

1-1-13- التشخيص Diagnosis:

1-1-13-1- التشخيص المباشر Direct diagnosis:

1-1-13-1-1- الفحص المجهري المباشر Direct microscopic test:

يعد من الطرق الأكثر استخداما في تشخيص الآفات الجلدية لأنها بسيطة وسريعة ولا تحتاج إلى كلفة عالية، تظهر اللاسوطيات داخل الخلايا البالعة الكبيرة وخارجها بعد تلوين اللطاخات الجلدية بغيمزا كأجسام زرقاء شاحبة بيضوية مع نوا ة حمراء قاتمة وصانعة محركة صغيرة نقطية الشكل.

تحضر لطاخات الفحص المباشر من القرحة، حيث تدخل ابره عقيمة متوسطة الحجم مع أو بدون حقن 0.01-0.05 مل مصل ملحي عقيم ثم تحرك الإبرة حركة دائرية حول مركزها مع ضغط خفيف للداخل لتحرير بعض الخلايا ثم تسحب حتى نحصل على كمية ضئيلة من النسج، ثم توضع على صفيحة زجاجية وتترك لتجف كما يمكن إجراء الفحص المباشر للطاخة مأخوذة من حواف شق جلدي تم إجراءه بواسطة شفرة قياس 11 ضمن العقيدة، هذا وتصل حساسية هذه الطريقة لغاية 60% (61).

أما لتشخيص الليشمانية الحشوية فيعتبر تلوين بزالة الطحال هو الأعلى حساسية 96% ولكن يحذر من خطورتها، يليها بزل نقي العظم بحساسية 70% ثم بزل العقد اللمفاوية 58% (62).

1-1-13-1-2- الزرع Culture:

تزرع العينة عند الشك بوجود إصابة بالليشمانية وعدم القدرة على كشف الطفيلي في عينة الفحص المباشر، ويعتبر الزرع وسيلة أساسية في عزل الليشمانية وإكثارها بهدف إجراء التنميط النوعي بالطريقة الأنزيمية isoenzyme أو تقنيات البيولوجيا الجزيئية باستخدام الـDNA.

يستعمل عادة وسط ثنائي الطور كـ(Novy-Neal-Nicolle) ويتألف من 3.5 غرام أغار و1.5 غ كلوريد الصوديوم و250 مل ماء مقطر ودم أرنب منزوع الليفين بنسبة 15-30% وصادات حيوية (بنسلين،ستريبتومايسين) ومضاد فطري هو الفلورسيتوزين يتم الحضن بدرجة22°-27 يتم تحري الأشكال أمامية السوط أسبوعيا ولا يعتبر الزرع سلبيا إلا بعد مرور 4 أسابيع على إجرائه ومن أوساط الزرع الأخرى (11):

- وسط ايفانس Evans medium: وهو وسط غني غذائيا يستخدم بشكل ناجح لعزل أنواع كثيرة من الليشمانية في العالم القديم والجديد بشكليه الصلب والسائل.
- وسط شنايدر Shneider medium: وهو وسط حساس جدا تنمو فيه الممشوقات خلال 2-5 أيام.

- وسط MEM FCS EBLB Medium: وهو وسط غني غذائيا مناسب للنمو فقط وليس لعزل كل أنواع الليشمانية.
- وسط Revivingailing: وهو وسط نصف صلب مناسب لنمو أنواع الليشمانية.
- وسط USAMRU: وهو وسط غني غذائيا مفيد في عزل ونمو الليشمانية بشكليه الصلب والسائل.
- وسط جنين الدجاج: ويستعمل أيضا لزراعة الأنواع المختلفة من الليشمانية.
- وسط RPMI-1460: وهو وسط غني غذائيا مناسب لنمو طفيليات الليشمانية وليس لعزل أي نوع ليشماني.

تختلف حساسية هذه الطريقة وذلك حسب عيوشة الطفيليات في العينة ووسط الزرع ووجود انتان ثانوي وخبرة الفني كما أنه وسيلة مكلفة وتحتاج وقت طويل (61).

1-1-13-1-3- حقن حيوانات التجربة Animal inoculation:

تطبق هذه الطريقة في تشخيص الإصابات بطفيليات صعبة الزرع كالليشمانية البرازيلية وفي الحالات السلبية بطرق التشخيص السابقة مع الشك بالإصابة سريريا، ولكنها لا تستعمل كطرق تشخيص روتينية لأنها تحتاج لمدة طويلة لتأكيد الإصابة أو نفيها (63).

يعد الهامستر أو القداد المتوسطي الذهبي Mesocricetus auratus وفأر الـ BALB/C من أكثر الحيوانات المستعملة للحقن ويحقن في جلد الأنف وظهر القدم حيث يتكاثر الطفيلي وتبقى لـ7-10 أيام أو لعدة أسابيع، إذ يحدث انتفاخ مكان الحقن وتؤخذ بعدئذ عينة من الآفة أو خزعة نسيجية أو من الطحال تبعا لنوع الليشمانية الممرضة ليطبق عليها الفحص المجهري المباشر.

تجمع هذه الطريقة ميزات الوسط الحي in vivo ووسط الزجاج in vitro معا

1-1-13-1-4-الخزعة الجلدية Dermal biopsy:

تجرى في حال الشك بالتشخيص ويجب زرع جزء منها وإجراء لطاخة من الوجه المقطوع للجزء الآخر قبل تثبيته (طريقة اللطاخة الانطباعية باللمس) (42) والبحث عن الطفيلي فيها حيت تعطي حساسية أعلى قد تصل لـ76% (64).

1-1-13-2- التشخيص اللامباشر Indirect diagnosis:

1-1-13-2-1- تحري المناعة الخلوية Evaluation of cellular immunity:

1-1-13-2-1-1- اختبار الليشمانين أو اختبار مونتينغرو Leishmanin test (LST) or Montenegro skin test

ويجرى بحقن 0.5 مل من معلق الليشمانين (وهو عبارة عن مستضدات لأماميات السوط المزروعة المقتولة بالفينول في الوجه الراحي للساعد (داخل الأدمة) ويقرأ ناتج الحقن بعد 48-72 ساعة فإذا حدثت حمامى متصلبة بقطر 5 ملم أو أكثر يعتبر الاختبار ايجابيا (39).

يعد هذا الاختبار مماثلا لاختبار السلين (40)، ويصبح ايجابيا عند الأشخاص الذين لديهم تماس سابق مع الليشمانية واللذين تطورت لديهم مناعة خلوية و يحدث الانقلاب من السلبية للإيجابية بعد عدة أسابيع في الليشمانية الجلدية أما في الحشوية فيحدث بعد المعالجة والشفاء (39)، وهذه أهم الحالات التي يكون الاختبار ايجابيا فيها (39،65):

- إصابة سابقة.
- إصابة حالية بداء الليشمانيات الجلدي (عند الوصول لمرحلة التقشر).
- إصابة حالية بالليشمانية الجلدية المخاطية.
- بعد الشفاء من الليشمانية الحشوية.
- إصابة تحت سريرية لأدواء الليشمانية "ايجابي عند أشخاص أصحاء في مناطق توطن الليشمانية" (أشخاص تعرضوا للإصابة و لم تظهر عليهم أعراض مرضية " عديمي الأعراض").
- ايجابي بشدة في الليشمانية الناكسة.

ويكون سلبيا في الداء الحشوي الفعال والداء الجلدي المنتشر والجلدي الحديث الذي لم تتجاوز مدة إصابته شهرا واحدا.

تبلغ حساسية هذا الاختبار 85% ونوعيته 100%، ولا يوجد اختلافات هامة إحصائيا تتعلق بالعمر والعرق أو حجم الآفة أو نوع الليشمانية (65)، كما يمكن استخدامه في الدراسات الوبائية لداء الليشمانية الجلدي حيث تعتبر ايجابيته بنسبة 5% من سكان منطقة ما مشعرا لتوطن الداء فيها (66).

1-1-13-2-1-2-اختبـار تكـاثر اللمفاويـات Lymphocyte proliferation assay (LPA):

ويجرى بحضن لمفاويات الدم المحيطي مع خلاصة مسوطات ليشمانية لمدة 6 أيام وقياس مدى تكاثرها (67)، ويستخدم أيضا لمعرفة الاستجابة الخلوية ويكون ايجابيا في الإصابة الحالية والسابقة لليشمانية (68).

1-1-13-2-2- الاختبارات المناعية المصلية Immuno –Serological assays:

تعتمد هذه الاختبارات على كشف الأضداد الجوالة في المصل، وتستخدم بشكل أساسي لتشخيص داء الليشمانيات الحشوية الذي تتدخل فيه المناعة الخلطية وذلك بإنتاج كمية من الأضداد تنتشر في الدوران، في حين استخدم هذا الاختبار بشكل محدود لتشخيص الإصابة الجلدية بسبب انخفاض عيار الأضداد (69،70)، من مساوئ هذه الاختبارات أن لها تفاعلات متصالبة مع أمراض أخرى مما يجعل تفسير النتائج أمرا صعبا (71)، بالإضافة لانخفاض مصداقيتها عند مضعفي المناعة (72،73)، ومع ذلك تستخدم في الدراسات والمسوحات الوبائية ونذكر منها:

1-1-13-2-2-1- التراص المباشر Direct agglutination test (DAT):

ويعتبر اختبارا مسحيا مناسبا، ويعتمد على التراص بين المصول الايجابية والمستضدات الملونة والمثبتة، في دراسة على ليشمانية جلدية معالجة بلغت حساسية الاختبار 100% ونوعيته 99.3%، كما أن استخدام مستضدات مجففة ومبردة والتي تعد أكثر ثباتا زاد أهمية استخدامها في الدراسات الحقلية (74).

1-1-13-2-2-2- المقايسة بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ويتم كشف الأضداد بواسطة مستضدات مثبتة في آبار خاصة يضاف إليها ضد الضد المرتبط بأنزيم معين يكشف باستعمال ركيزة خميرية خاصة.

لقد استخدم اختبار الاليزا في تشخيص الليشمانية الجلدية في سوريا وبلغت حساسيته ونوعيته 92.5% و 100% على الترتيب (75).

استخدم في الآونة الأخيرة المستضد النوعي المأشوب (rK39 (recombinant Kinesin 39 الذي تتشكل تجاهه أضداد نوعية للكشف عن داء الليشمانيات الحشوي الذي يسببه أحد الطفيليات التابعة لمعقد L.d.complex، حيث بلغت درجة حساسية ونوعية اختبار المقايسة المناعية باستخدام هذا المستضد 100% تقريباً (76).

1-1-13-2-2-3- التألق المناعي Immunofluorescence assay (IFA):

يُطبق اختبار التألق المناعي باستخدام العناصر المسوطة لطفيلي الليشمانية كمستضدات وضد الـ IgG المعلم بمادة مفلورة غالباً، وتظهر إيجابية هذا الاختبار بملاحظة تألق كامل العنصر المسوط بما فيه السوط وذلك باستعمال مجهر خاص لقراءة صفائح التألق، وقد أشارت دراسات عديدة حول تشخيص داء الليشمانيات باختبار التألق المناعي باستخدام مستضدات نقية لطفيلي الليشمانية الدونوفانية أو الطفلية أو المدارية أو الكبيرة إلى ارتفاع درجة حساسية هذا الاختبار ونوعيته لعدم حدوث أية تفاعلات متصالبة مع أمراض أخرى: كالسل والملاريا الخ (63،77).

1-1-13-2-2-4- البقعة الغربية Western blot:

ويتم فصل البروتينات المستضدية لطفيلي الليشمانية بواسطة الرحلان الكهربي، ثم يتم حضنها مع مصل المريض وفي هذه المقايسة يمكن وبنفس الوقت تمييز أضداد مختلفة باستخدام عدة منتجات مستضدية (40).

وقد وجد في مصول مرضى الليشمانية الجلدية التالية للكلاآزار PKDL أضداد لمستضدات 65و110 كيلو دالتون غير موجودة عند مرضى الليشمانية الحشوية الذين ليس لديهم PKDL وبذلك يمكن الاستفادة من هذه الميزة لكشف هذا الاختلاط (78).

1-1-13-2-2-5- اختبار شريط الاستشراب المناعي Immunochromatochraphic strip –test(ICT)

تم حديثا تطوير rk39 dipstick ويتم فيه ربط المستضد rk39 ذو القدرة العالية على توليد الأضداد بركيزة خاصة تضاف إليها مصل المريض وعند رحلان الأضداد – anti-K39 antibody ضمن الركيزة وتفاعلها مع المستضدات تعطي شريطا لونيا يشاهد عيانيا (79).

والمستضد rk39 هو مستضد مأشوب تم الحصول عليه نتيجة عملية دمج مشتق من اتحاد 39 حمض أميني مكرر في طفيلي الليشمانية الشاغاسية (80)، وقد وجد أن حساسية الـ dipstick rk39 100% ونوعيته 100% عند تطبيقه على مرضى الليشمانية الحشوية في نيبال وفينزويلا (80،81).

إن الشكل الأحدث لهذا الاختبار هو استخدام الهلام كركيزة حيث يتم إضافة كل من العينة (المصل) والمستضدات إلى الهلام لتندمج ضمنه وفي حال وجود الأضداد ضمن العينة فإنها ترتبط مع المستضدات مشكلة معقد مناعي يظهر عيانيا بشكل جزيئات دقيقة حمراء اللون على سطح الهلام أو منتشرة ضمنه (79).

يمكن استخدام هذا الاختبار في المسح الوبائي للمناطق الموبوءة بالليشمانية الحشوية كونه من الطرق الحديثة والسريعة بالتشخيص (79).

1-1-13-3- تحديد أنواع وتحت أنواع الليشمانية Identification of Leishmania speices and subspecies

1-1-13-3-1- تحليل نظائر الإنزيم isoenzyme analysis: وتعتبر طريقة مرجعية مقبولة لتشخيص نوع وسلالة الليشمانية، ويعتمد على حركية الرحلان الكهربي إما على هلامة النشاء أو على أسيتات السللوز باستخدام شدة تيار منخفضة وفترة ترحيل طويلة، ثم مقارنة النمط الإنزيمي للذراري (السلالات) المدروسة بسلالات مرجعية من أجل تحديد سلالات طفيلي الليشمانية التي يكون لها نمط إنزيمي متماثل (هجرة إنزيمية للمكان نفسه) وجمعها في وحدات تصنيفية "Zymodeme"(جمهرة وراثية إنزيمية)، حيث تمّ التأكيد على ضرورة دراسة حركية 10-20 إنزيم على الأقل من أجل تصنيف سلالة جديدة في zymodemes (63،82) وقد وجد أن الليشمانية المنحازة حشويا والليشمانية الطفلية الدونوفانية المنحازة جلديا تختلف في وحداتها التصنيفية الـ zymodemes (83).

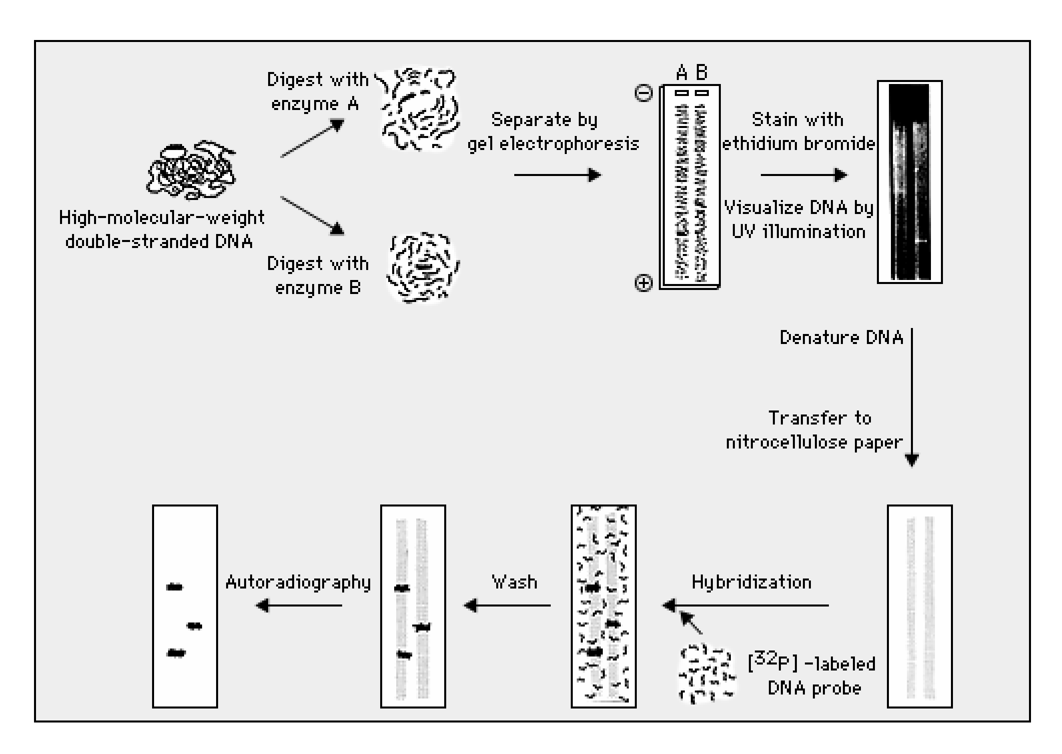
تعتبر هذه الطريقة مكلفة وطويلة ولا يمكن إجراءها إلا في مخابر مرجعية خاصة والتي غالبا ما تسمي السلالات الجديدة بأسمائها مثال LON- for London School of Hygiene Tropical Medicine, or MON- for University of Montpellier ومع ذلك استخدمت هذه الطريقة بشكل واسع الانتشار في التصنيف (84،85).

1-1-13-3-2- العامل المفرز Excreted factor (EF):

ويشير العامل المفرز إلى مستضدات منحلة توجد في الوسط الذي تنمو فيه أماميات السوط، يجرى انتشار بالجيل للوسط الزرعي حيث يتم ترسيب الـ EF بالأضداد الليشمانية لنفس النوع (40).

1-1-13-4- الأساليب التشخيصية المعتمدة على الدنا DNA based methods:

1-1-13-4-1- الأساليب الكلاسيكية (التقليدية) Classical methods: التي تعتمد على التهجين والتقطيع ومنها البقعة الجنوبية Southern blotting وذلك باستخدام المسابير المعلمة (الموسومة) للتهجين حيث تلطخ الأشكال الأمامية السوط المغسولة على فلاتر من النتروسللوز ويتم تهجينها مع قطع مأشوبة وموسومة من الحلقة الصغيرة الـminicircle للطفيلي وتعتبر من الطرق الحساسة في التشخيص (86).



الشكل (15) مراحل التهجين.

2-4-13-1-1- أساليب حديثة تعتمد على التفاعل السلسلي للبوليميراز

Modern methods based on the polymerase chain reaction (PCR):

يعتمد مبدأ التفاعل السلسلي البوليميرازي PCR على عمل إنزيم النسخ الذي يعرف باسم DNA polymerase، حيث يقوم هذا الإنزيم بتركيب جزيئة مضاعفة من الـ DNA من القالب أو النسخة الأصل من الـDNA في الدورة الأولى من عملية المضاعفة في جهاز الدوار الحراري وتصبح الجزيئات القديمة والجديدة القالب الثاني لدورة أخرى من النسخ وهكذا تتم عملية النسخ في كل دورة بزيادة أسية، وبذلك يمكن أن نحصل من جزيئة DNA مفردة على ملايين النسخ من الـDNA المراد مضاعفته بواسطة هذا التفاعل خلال عدة ساعات فقط وللقيام بهذا التفاعل لابد من توفر المواد التالية:

1- البادئات Primers: والبادئة أو المشرع عبارة عن تسلسل من النوكليوتيدات oligonucleotides (25-10 أساس آزوني) قادرة على الارتباط مع الأسس الآزوتية للحمض النووي المراد تضخيمه، وذلك في منطقة ذات ترتيب مميز ونوعي من الحمض النووي.

2- كميات كافية من النوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين deoxynucleoside triphosphates dATP,dCTP,dGTP,dTTP (dNTPs) للمشاركة في تشكيل قطع الـ DNA المستنسخة.

3- إنزيم نسخ الـ DNA polymerase :DNA مقاوم للحرارة المرتفعة كإنزيم Taq polymerase لتشكيل قطع الـ DNA الجديدة .

4- محاليل واقية Buffers: لتوفير الوسط المناسب للتفاعل.

5- شوارد المغنزيوم Mg^{+2}: من محلول كلور المغنزيوم التي تعتبر عامل مساعد لإنزيم البوليميراز .

6- ماء مقطر.

7- عينة الـ DNA.

مراحل عملية الـPCR:

1- مرحلة الانشطار أو التمسخ Denaturation: يرفع جهاز الدوار الحراري درجة الحرارة إلى94° م مما يؤدي إلى فصل شريط الـ DNA المضاعف إلى سلسلتين مفردتين.

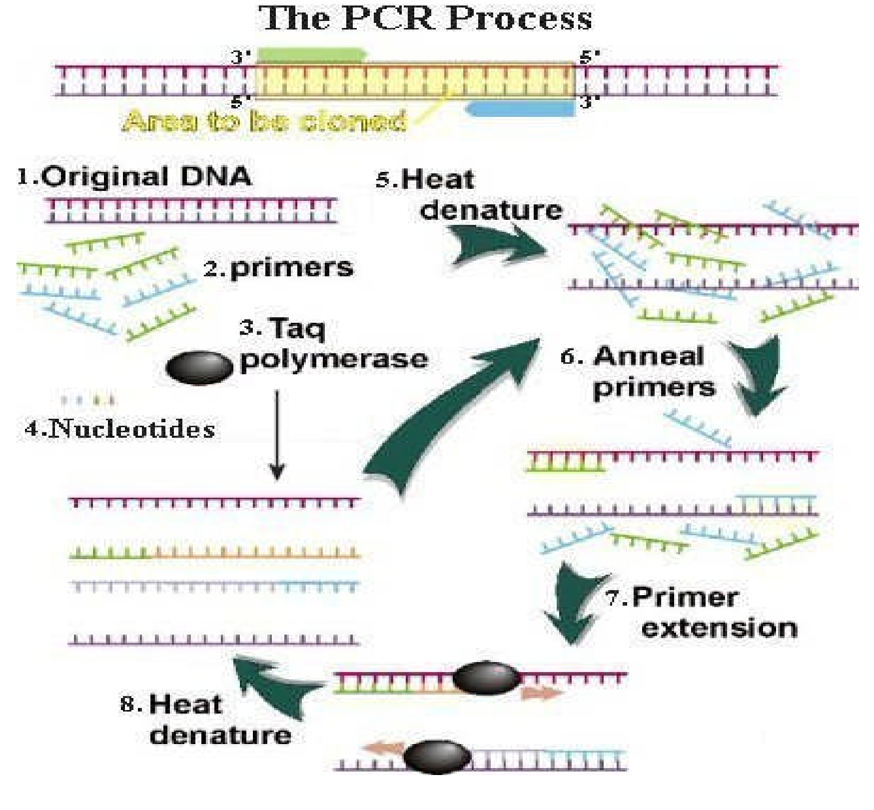
2- مرحلة ارتباط المشرع أو التطويع Annealing: يخفض الجهاز الحرارة إلى الدرجة °(40-60) م حسب نوع البادئة المستخدمة إذ أن لكل بادئة درجة حرارة مثلى لارتباطها على شريط الـ DNA المفرد حيث تتم ارتباط (تزاوج) البادئة دائما على الموقع المناسب بالاتجاه ´5 إلى ´3 وذلك تبعا لتتطابق الأسس المكونة لها مع السلسلة المفردة لشريط الـ DNA.

3- مرحلة النسخ أو الامتداد Extension: يرفع الجهاز درجة الحرارة إلى 72° م (الدرجة المثلى لعمل إنزيم النسخ Taq polymerase) حيث يقوم الإنزيم بنسخ سلسلة متممة لسلسة الـ DNA المفردة وذلك بإضافة النوكليوتيدات (dNTPs) من الطرف´5 إلى´3 قارئة من القالب من´3 إلى´5 وهكذا تعاد المراحل السابقة في الدورة الثانية وهكذا حتى نحصل على ملايين النسخ من قطعة الـ DNA الهدف التي يتم الكشف عنه بالرحلان الكهربي على جيل الآغار.

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق التشخيصية، إذ أن حساسيتها ونوعيتها عالية (87-90)، وهي في تطور مستمر ويمكن تطبيقها على عينات مختلفة: كتلك المأخوذة بالماسحة القطنية واللطاخات المؤرشفة والخزعات المغمورة بالبارافين (91،92،40).

يمكن استخدام مستهدفات مختلفة للتضخيم وذلك حسب الغرض من الدراسة مثلا للتشخيص نختار سلسلة عديدة التكرارات ولزيادة الحساسية تكون المنطقة المضخمة عالية الحفظ highly

conserved أي أن نفسها موجودة في الجنس أو حتى داخل الأنواع (40)، بينما لدراسة الصفات الجينية للسلالات الفردية individual strains نختار مناطق متغيرة أكثر والتي لا تتواجد بأعداد كبيرة من النسخ وبناء عليه تكون هدفا أقل حساسية (40)، هذا ويمكن تحسين النوعية بواسطة تقطيع نواتج الـ PCR (restriction fragment analysis of the PCR) كما يمكن زيادة الحساسية والنوعية بتهجين منتجات الـ PCR (Southern blotting) (40).



الشكل (16) مراحل الـPCR.

مستهدفات الـ PCR Target PCR:

1-1-13-4-2-1- دنا الصانعة المحركة Kinetoplast DNA (KDNA): توجد الحلقة الصغيرة minicircle في دنا الصانعة المحركة بحوالي 10000 نسخة وطولها حوالي 800bp تتألف هذه الحلقة من منطقتين منطقة ثابتة طولها 120bp لايتغير تسلسل الدنا فيها بين أنواع الليشمانية بينما الجزء الأكبر من الحلقة الصغيرة يتألف من منطقة متغيرة وقد تم الاستفادة من هذه الميزة في استخدام الـ PCR للتصنيف النوعي لأجناس الليشمانية بناء على الاختلاف في تسلسل هذه القطعة (61).

تبدي تحت الأنواع المختلفة اختلافات إلى حد ما فبعض الأنواع تتشاطر نفس المنطقة وبعضها تختلف بين النسائل حتى ضمن نفس السلالة ويمكن تفسير هذا بسرعة تطور السلسلة في الحلقة الصغيرة، وعلى النقيض بعض أصناف الحلقة الصغيرة تبقى الحلقة ثابتة ضمن الأنواع حتى لو

كانت من مناطق جغرافية مختلفة (93)، وهذا ما يجعل تصميم مشرعات نوعية للنوع مشكلة ومع ذلك طورت مشرعات واستخدمت للتمييز بين بعض الأنواع (94،95).

1-1-13-4-2-2-المستهدفات النووية Nuclear targets:

1-1-13-4-2-2-1-الرنا الريبوزومي بتحت وحدته الصغيرة (ssuRNA) small subunit ribosoma RNA: أو مايسمى المورثة 18S rDNA وهي المورثة المسؤولة عن تشكيل سلسلة 18S RNA ريبوزومي الذي يدخل بتركيب الوحدة الصغيرة من الجسيم الريبي (الريباز) وتحوي هذه المورثة على منطقتين:

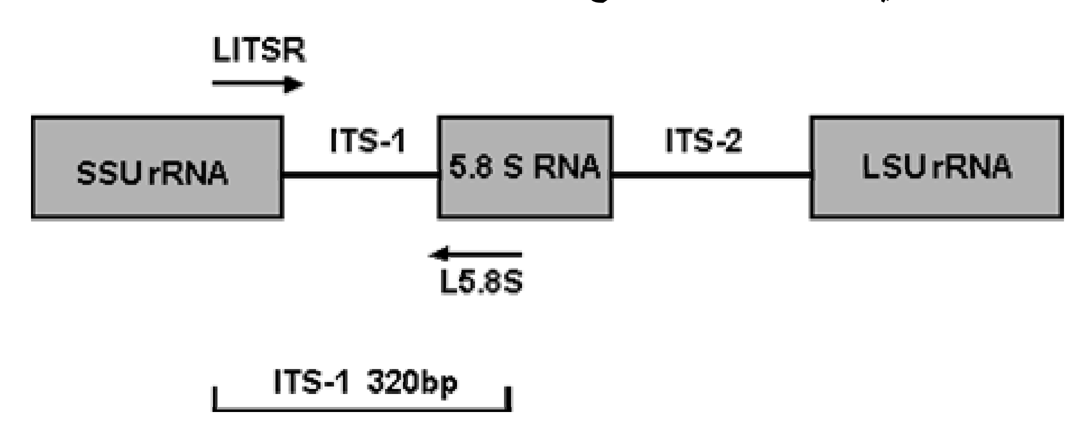
المنطقة الأولى: تحتوي على تسلسلات نوكليوتيدية عالية الحفظ (التغيرات فيها نادرة جدا).

المنطقة الثانية: تحتوي على تسلسلات نوكليوتيدية متغيرة من نوع لآخر والتي غالبا ما تكون نوعية للنوع، لذلك تعتبر كلتا المنطقتين من مستهدفات الطرق التشخيصية النوعية مما زاد من استخدامها من أجل تحديد الاختلافات بين الأنواع، هذا بالإضافة لكون هذه المورثة عالية الانتساخ (يوجد منها حوالي 200 نسخة) الذي زاد من حساسية الـPCR أيضا (96).

1-1-13-4-2-2-2- الفراغات البينية المشفرة Internal transcribed spacer (ITS):

توجد بين المورثة المسؤولة عن تشكيل كل من18S rRNA و5.8S rRNA مناطق تحوي تسلسل نكليوتيدي لا يلعب دورا وظيفيا تسمى الفراغات البينية ITS1، يختلف التسلسل النوكليوتيدي في هذه المنطقة بنسبة عالية بين الأنواع لهذا تلعب هذه المنطقة دورا هاما في التفريق بين الأنواع وتحت الأنواع على المستوى الجزيئي .

كذلك توجد بين المورثات المسؤولة عن تشكيل كل من 5.8S rRNA و28S rRNA منطقة تحتوي تسلسل نكليوتيدي لا يلعب دورا وظيفيا تسمى الفراغات البينية المشفرة (ITS2) يختلف التسلسل النكليوتيدي فيها أيضا حسب الأنواع .



الشكل (17) مواقع الفراغات البينية المشفرة (40).

استخدمت الفراغات البينية المشفرة داخل RNA بشكل واسع كمستهدفات حساسة في الـ PCR (97،98)، وفي حال إشراكها مع تقنية تقطيع الـDNA لمناطق ITS المضخمة فإنه يمكن تمييز كل معقدات الليشمانية (40).

1-1-13-4-2-2-3- الاكزون الصغير mini-exone أو التعاقب القائد التضفيري Spliced leader sequence: وهو المورثة التي تشترك في تضفير transsplicing الـmRNA النووي والتي تتواجد بحدود 100-200 نسخة ضمن الجينوم النووي وكل تكرار يتألف من 3 أجزاء رئيسية: المنطقة المترجمة وهي اكزون يحوي 39 أساس أزوتي عالي الحفظ، والمنطقة الثانية هي انترون متغير بشكل معتدل يضم 55-101 bp والمنطقة الثالثة غير مترجمة وهي فراغات بينية intergenic spacer بطول بين (51-1350) bp أي أنها مختلفة الطول حسب الأجناس والأنواع هذه الميزات جعلت من الاكزون الصغير مشعرا جينيا هاما دعا العديد من الباحثين لاستخدامه (99،100،101)

1-1-13-5- التنميط الجزيئي لسلالات الليشمانية Molecular strain typing of Leishmania:

نذكر من الطرق التي تعتمد على التفاعل السلسي البوليميرازي والمستخدمة في التنميط الجزيئي لسلالات الليشمانية مايلي:

1-1-13-5-1- التكثير العشوائي (غير المحدد) لأجزاء من الحمض النووي للطفيلي Randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR), arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

تعتمد هذه الطريقة على مضاعفة الـ DNA بالـPCR باستخدام بادئات صغيرة غير متخصصة (arbitrary primer) تتكون من 10 نوكليوتيدات، ثم يتم تحليل التفاعل بواسطة الرحلان الكهربي (gel electrophoresis) الذي يفصل نسخ الحمض النووي الناتجة حسب وزنها الجزيئي، وتقرأ النتيجة بتعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية حيث يظهر الناتج على شكل خط تسلسلي من نواتج التضخيم العديدة الأشكال التي تختلف باختلاف الأنواع وتتشابه بين أفراد النوع الواحد (102،103)، ولكن ما يؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى DNA طفيلي نقي وشروط تضخيم قياسية جدا هذا بالإضافة إلى صعوبة تفسير النتائج مما حد من استخدامها (104).

2-5-13-1-1-تقانة الإقتطاع الإنزيمي Restriction fragment length polymorphism (RFLP)or schizodeme analysis :

أي التعدد الشكلي في أطوال الشدف المقطعة إنزيميا أو تحليل الجمهرة الوراثية المنشقة، وتعتمد على تضخيم قطع محددة من الـ DNA بواسطة تقانة الـ PCR باستخدام بادئات متخصصة بتلك القطع المراد مضاعفتها، ثم يتم هضم قطع الـ DNA المضاعفة باستخدام إنزيمات الاقتطاع Restriction enzyme التي تقوم بقص قطع الـ DNA عند تتابعات نوكليوتيدية معينة (بحدود 6-4 أشفاع نوكليوتيدية) خاصة بكل إنزيم.

يمكن بتقنية الـ PCR وباستخدام بادئات متخصصة بتضخيم قطعة الـ DNA المراد مضاعفتها أن نكشف عن التباينات على مستوى الـ DNA عندما يكون هناك فروق في أطوال قطع الـ DNA المضخمة للعينات المدروسة والمجرى عليها التفاعل السلسلي البوليميرازي، ولكنها تصبح عاجزة إذا كانت تلك القطع متساوية بالطول لأنها سوف تعطي عصابات متماثلة لذلك يستخدم إنزيم الإقتطاع الذي يتعرف على وجود تتابع محدد من الأسس النوكليوتيدية ويقوم بقص شريطي الـDNA إلى عدة قطع يختلف عددها باختلاف عدد تكرارت المواقع الموافقة للإنزيم على الـDNA المدروس.

تستطيع هذه التقنية تحديد التباينات الشكلية على مستوى الـDNA بين الأنواع وتحت الأنواع وذلك بعد فصل قطع الـ DNA المختلفة بالرحلان الكهربي اعتمادا على طولها وأوزانها الجزيئية، وتكون نماذج التقطيع الناتجة أو الشدفات نوعية للنوع أو حتى للسلالات الفردية إذ يشير التعدد الشكلي في الشدفات إلى اختلاف في التسلسل النوكليوتيدي.

تعد هذه الطريقة من الوسائل القيمة للدراسات الوبائية والتشخيص النوعي للنوع (105،106)، إذ يمكن للطفرات النقطية أن تغير النموذج بسبب تغييرها لأماكن الإقتطاع وهذا يخدم التصنيف الجيني، ولكنها تصبح عاجزة في حال عدم وجود مواقع لإنزيمات الإقتطاع على قطع الـDNA المدروسة لذلك نلجأ إلى استخدام تقنيات أخرى كالتقنية التالية.

3-5-13-1-1- تحديد التسلسل النوكليوتيدي لشدفة الـ DNA الهدف (sequencing):

إن هدف عملية الـ Sequencing هو تحديد التتابع النوكليوتيدي للمورثات أو قطع الـDNA الهدف وبالتالي تحديد جميع التباينات الموجودة على مستوى الـDNA بين العينات المدروسة، ويتم البدء بهذه التقنية اعتبارا من منتجات الـ PCR وذلك عن طريق تفاعل سلسلي بوليميرازي خاص بهذه التقنية يستخدم فيها نوكليوتيدات معلمة بالفلور تسمى ddNTP's بالإضافة للنوكليوتيدات الطبيعية dNTP's (107) وفق الخطوات التالية:

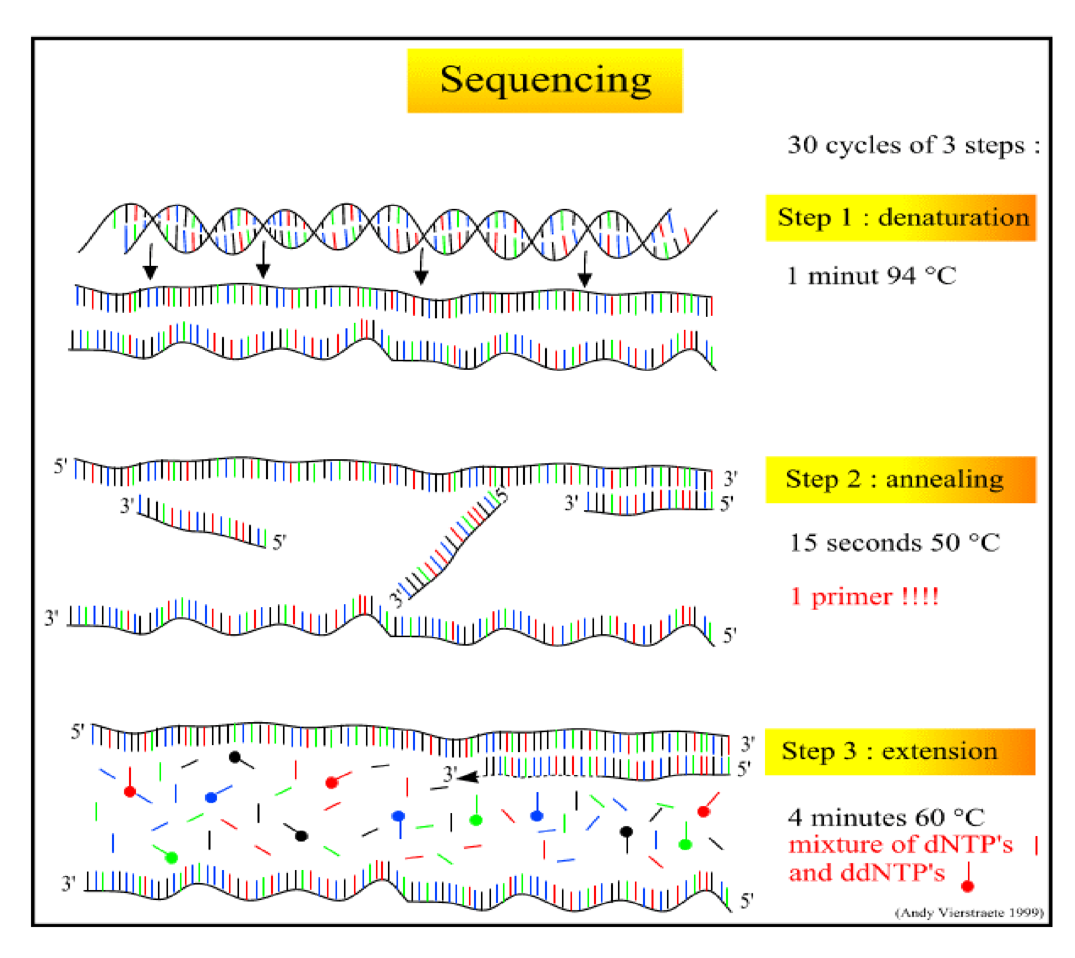
1-1-13-5-3-1- تفاعل تحديد التسلسل النوكليوتيدي:

يتم تحديد التسلسل النوكليوتيدي بدورة عمل تكرر من 20 إلى 30 مرة آلياً، وتتألف كل دورة من المراحل الثلاث التالية (الشكل 18):

أ. مرحلة تمسّخ سلسلتي الـ DNA للشدفة الهدف المضخّمة: تتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 94^o، لتمسخ الشريط المضاعف لشدفة الـ DNA الهدف.

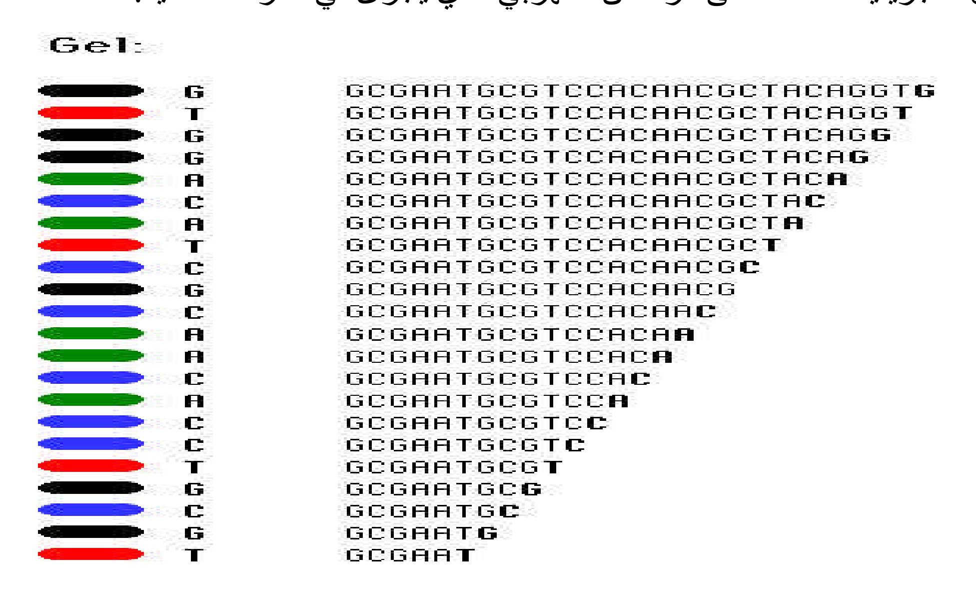
ب. مرحلة ارتباط المشرع بالسلسة الهدف أوالتطوِّيع: ويجرى بالدرجة 50^o ويستخدم أحد المشرعين المستخدمين في تفاعل الـ PCR الأول المضخم لشدفة الـ DNA الهدف (يستخدم المَشْرَع الأيسر أو الأيمن)، ولذلك يجرى في هذا التفاعل انتساخ شدفة واحدة فقط من إحدى سلسلتي الـ DNA، بينما في تفاعل الـ PCR العادي يجري استخدام مشرعين (أيمن وأيسر) وبالتالي يجري تضخيم نسخ لكلا السلسلتين معاً، يرتبط المشرع بشدفة محددة من سلسلة الـ DNA المقابلة لها من حيث الأسس الآزوتية، ويتم ذلك الارتباط عبر روابط الفسفور ما بين نوكليوتيدات المشرع ونوكليوتيدات السلسلة الهدف.

ج. مرحلة الامتداد أو تركيب الشدفة الهدف: وتُجرى عند درجة حرارة 60^o، وتعد هذه الدرجة مثاليةً لعمل إنزيم البوليميراز polymerase (تكون الدرجة المستخدمة في هذه المرحلة هي 72^o عادةً، ولكن على اعتبار أنه تستخدم هنا نكليوتيدات ذات نهاية موسومة labeled بمادة متفلورة ddNTP's، فإن درجة الحرارة الفعالة المعتمدة هنا هي 60 بدلاً من 72^o). بعد ارتباط المَشْرَع في المرحلة السابقة يتم في هذه المرحلة ارتباط النوكليوتيدات (dNTP's أو ddNTP's) إلى السلسة الهدف وتركيب السلسة المكملة ابتداء من الطرف َ3 باتجاه الطرف َ5، بإضافة كلا النوعين من النوكليوتيدات خلال تركيب السلسلة المكملة، ولكن عندما يضاف نوكليوتيد مفلور ddNTP إلى سلسة الهدف تتوقف عملية التركيب لأنه يحتوي على ذرة هيدروجين H على ذرة الكربون الثالثة (يحتوي النوكليوتيد العادي dNTP على وظيفة ماءات OH في هذا الموقع عادة عوضاً عن ذرة الهيدروجين)، وعلى اعتبار أن هذا النوكليوتيد يحوي جزيئاً مفلوراً، فإنه من الممكن تحديد اللون لآخر نوكليوتيد مرتبط مع السلسلة الهدف باستخدام رحلان كهربي خاص وبوجود أشعة الليزر.



الشكل (18) مراحل تحديد التسلسل النوكليوتيدي.

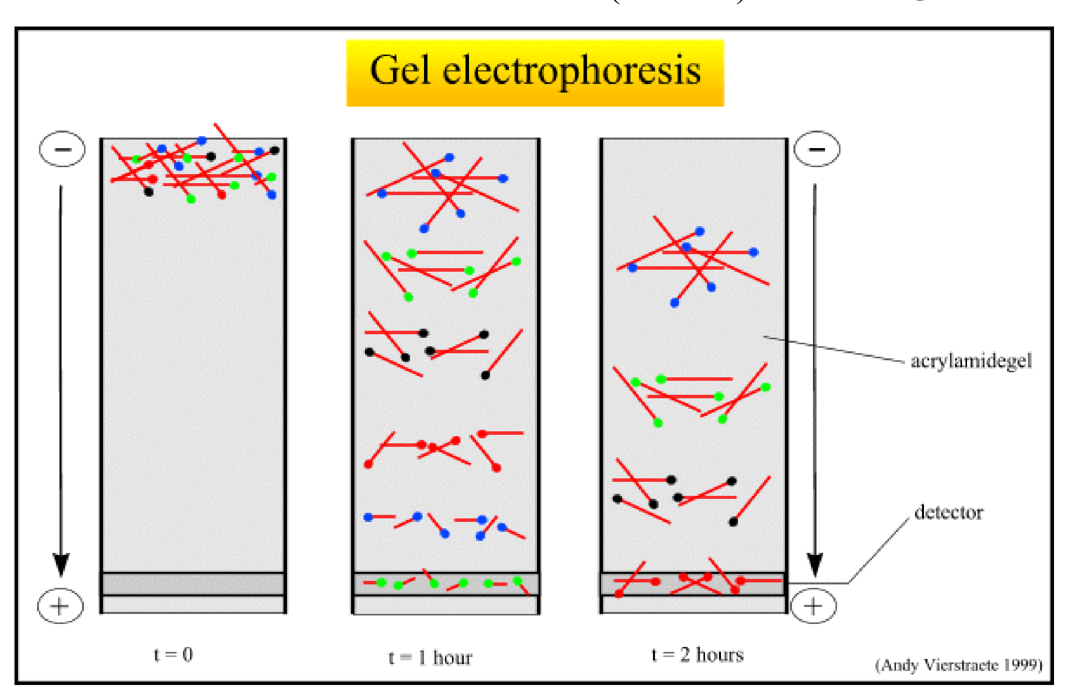
إذا يحدث في هذا التفاعل تضاعف إحدى سلسلتي الـ DNA الهدف وفق زيادة خطية، ليتشكل في النهاية نسخ عديدة من الدنا تختلف فيما بينها بأساس واحد موسوم والذي يمكن من فصلها بحسب أوزانها الجزيئية اعتمادا على الرحلان الكهربي الذي يجرى في المرحلة التالية.



الشكل (19): قطع الدنا المتشكلة في نهاية التفاعل.

1-1-13-5-3-2- فصل الجزيئات المضاعفة بواسطة الرحلان كهربي:

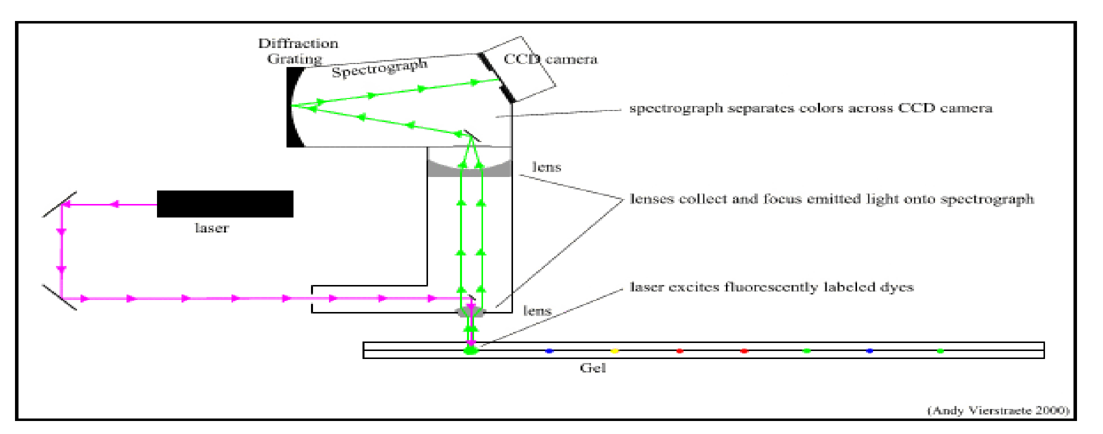
بعد عملية تفاعل تحديد التسلسل النوكليوتيدي، يتم فصل خليط السلاسل الناتج المكون من سلاسل مختلفة ومتدرجة في أطوالها على جهاز رحلان كهربي، وتتكون هلامة الفصل من مادة البولي أكريلاميد، القادرة على فصل شدفتي DNA تختلفان عن بعضهما بنوكليوتيد واحد زيادةً أو نقصاً، تحتوي شدف الـ DNA على شحنة سالبة بسبب وجود شاردة الفسفور في جزيئات النوكليوتيدات المكونة لها، وبالتالي فهي تهاجر نحو القطب الموجب في الرحلان الكهربي. تهاجر الشدف الأصغر بشكل أسرع من تلك الأكبر، وبالتالي تصطف شدف الـ DNA حسب أطوالها على وسط الفصل (الشكل 20).



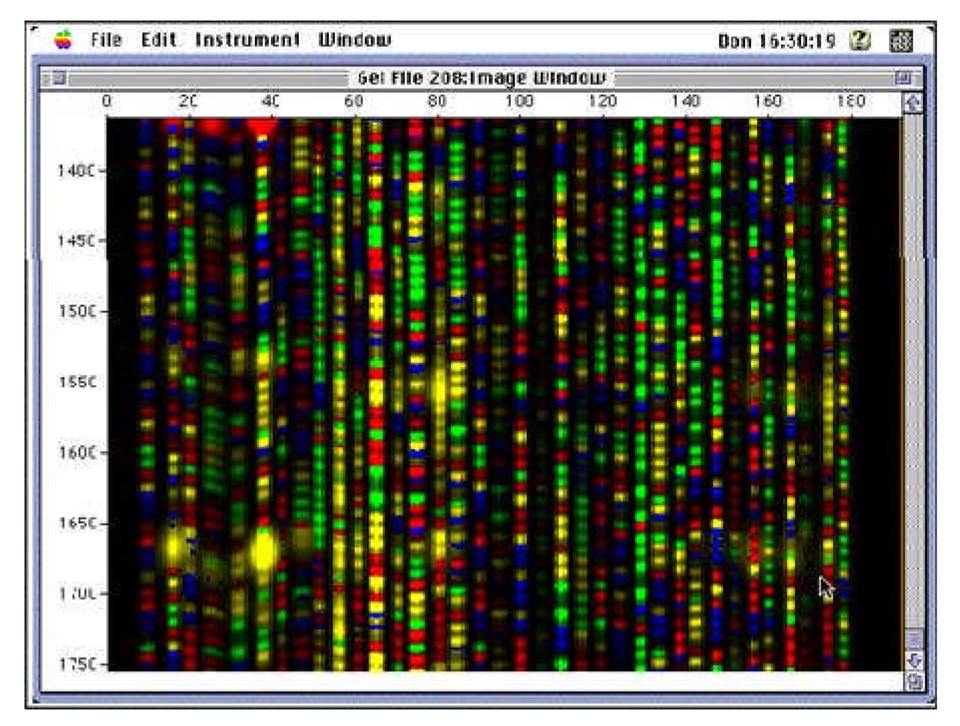
الشكل (20): انفصال شدف الـ DNA على هلامة الفصل ضمن وسط الرحلان الكهربي.

1-1-13-5-3-3-تحديد التسلسل على جهاز الرحلان: automated sequencer :

تمر شدف الـDNA المهاجرة والحاوية على النوكليوتيدات المفلورة ضمن هلام الفصل الذي يحوي في نهايته نافذة تصدر أشعة ليزرية، فعند مرور شدف الـ DNA هذه أمام النافذة الليزرية تصدر Emission ألواناً مختلفة حسب نوع النوكليوتيد، تجمع هذه الإشعاعات اللونية وتوجه نحو كاميرا خاصة coupled device camera charge(CCD) (الشكل 21)، إذا وبما أن كل نوكليوتيدة مفلورة تملك لونا خاصا بها فإن جهاز الـ Sequencer يحدد ترتيب الأسس الموجودة وتترجم ضمن برنامج حاسوبي خاص لهذا الهدف (الشكل 22).



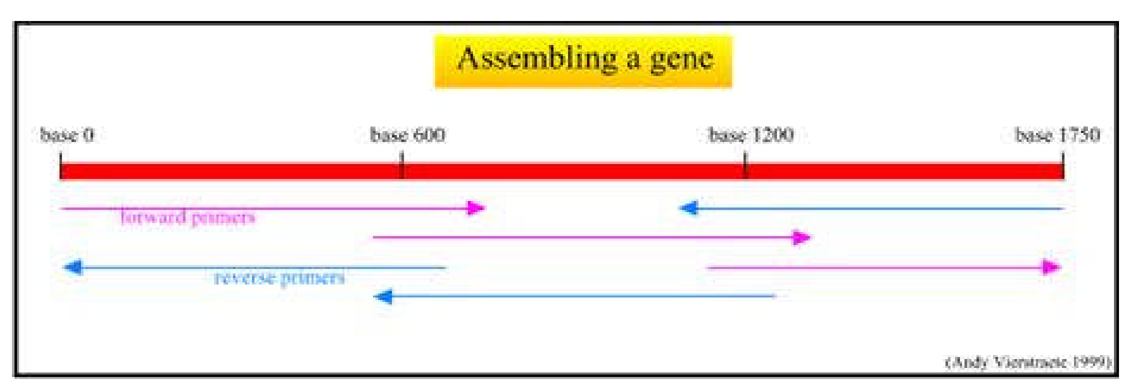
الشكل (21): مبدأ عمل والتقاط الأشعة ضمن جهاز الرحلان الكهربي.



الشكل (22): صورة هلامة الفصل الناتجة عن عملية الرحلان الكهربي وتحويلها ضمن برنامج حاسوبي خاص إلى ملف صورة.

1-1-13-5-3-4- تجميع أجزاء شدف الـ DNA المحددة التسلسل النوكليوتيدي:

يتم تحديد التسلسل النوكليوتيدي للشدفة الهدف من كلا الجهتين (باستخدام المَشْرَع الأيمن والأيسر ضمن تفاعلين منفصلين) ثم يتم التأكد من صحة التسلسل بمقارنة التسلسل الناتج من كلا الجهتين. إن طول الشدفة الهدف التي يمكن تحديد التسلسل النوكليوتيدات لها تتروارح من 750 وحتى 800 نوكليوتيداً، وبالتالي إذا كانت الشدفة الهدف أطول من ذلك، يتم تحديد التسلسل النوكليوتيدي لشدف صغيرة ثم تجميع التسلسل النوكليوتيدي لكامل الشدفة الهدف، ولتحقيق ذلك يتم استخدام بادئات مختلفة بحيث تغطي الشدفة الهدف الشكل (23).



الشكل (23): تجميع التسلسلات النوكليوتيدية للشدفة الهدف.

1-1-14- المعالجة Treatment:

إن اختيار المعالجة يتأثر بالشكل السريري للمرض والمنطقة الجغرافية التي تتوطن فيها الإصابة، وكذلك الحالة المناعية للمصاب، ولابد للمعالجة أن تحقق التوازن بين الفائدة منها والضرر الناجم عن استعمال الأدوية، فهي من أهم الطرق للسيطرة على الطفيلي ومنع انتشاره بين الناس في الليشمانية المدارية التي يكون الإنسان مستودعها الأساسي ومصدر العدوى بها، بينما يبقى استعمالها ثانوي في الحالات التي تسببها الليشمانية الكبيرة والتي غالبا ما تكون بشكل أفات جلدية محددة لذاتها وتشفى تلقائيا خلال 12 شهر، وبذلك تبقى الحكمة من علاج خمج محدد لذاته هو تجنب تشكل ندبات مشوهة في المناطق المكشوفة خاصة الوجه وتجنب الإنتان الثانوي والسيطرة على المرض وتجنب احتمال عدم حدوث الشفاء العفوي كما هو الحال في الأنواع الجلدية المنتشرة والناكسة التي قد يستمر المرض بها 20-40 سنة بدون معالجة (108).

وبشكل عام يمكن تقسيم المعالجة إلى جهازية وموضعية (108):

1-1-14-1- المعالجات الموضعية: وتهدف بشكل عام إلى تجنب التأثيرات الجانبية الكثيرة للمعالجة الجهازية، ولكنها تغدو غير عملية عندما يكون عدد الآفات كبيرا، كما أنها لا تطبق عندما يخشى من تشوه جمالي أو في المناطق الحساسة والخطرة (كالأجفان والشفاه وصيوان الأذن والمفاصل)، إضافة إلى ذلك فإن المعالجة الموضعية لا تفي بالغرض في الليشمانية المخاطية والحشوية ولا في بعض الأشكال الخاصة من الليشمانية الجلدية (الذئبانية والجلدية المنتشرة وقرحة شيكليرو والليشمانية الجلدية الناجمة عن مجموعة الليشمانية البرازيلية) (109)، وتتضمن المعالجة الموضعية: العلاجات الفيزيائية (البرودة والحرارة وغيرها) والمعالجات الدوائية بالحقن أو بالتطبيق الموضعي والجراحة.

1-1-14-1-1- المعالجة القرية: وتعتبر المعالجة الأفضل للحالات المحددة غير المختلطة (110)، فقد ذكر من طرائقها: التطبيق الموضعي للفحم الثلجي لمدة 60 ثانية، و الآزوت السائل المطبق بماسحة قطنية صوفية لمدة 10-25 ثانية مع امتداد التجميد لـ 1-2 ملم حول الآفة

بفواصل أسبوعية، هذا ويعد الآزوت السائل من أكثر العناصر السائلة المستعملة في الأمراض الجلدية، أما آلية التجميد فهي تحويل الماء الحر في النسيج إلى أشكال خاملة ترفع الضغط داخل الخلية مما يؤدي إلى تمزق جدار الخلية وموتها، كما أن نقص الإماهة الناجم يغير درجة حموضة الخلية PH ويؤدي التجميد لحدوث ما يسمى بالتمنيع القري حيث يشكل النسيج المجمد مستضدا جديدا، ومن المعلوم أن المعالجة القرية بكافة أنواعها مؤلمة للمريض وكثيرا ما تترك تصبغ دائم في المرضى قاتمي البشرة.

1-1-14-1-2- الطرائق الفيزيائية: وتقوم على تدمير الطفيلي فيزيائيا وذلك باستخدام الحرارة أو البرودة بشكل رئيسي، وقد ذكرت عدة بروتوكلات ممكنة بكل طريقة من هذه الطرائق، فقد جربت المعالجة الموضعية كون طفيلي الليشمانية لا يقاوم حرارة أعلى من 37 درجة، ويعتقد أن الحرارة تحرض استجابة مناعية كافية للقضاء عليه خلال تسخين الآفة لدرجة 55^{o} لمدة 5 دقائق (110،111)، كما جربت تسخين الآفة لـ 50^{o} درجة لمدة 30 ثانية وأعطت نتائج مرضية مما يشجع على استخدامها كبديل لأملاح الأنتموان (112).

ومن العلاجات الفيزيائية المذكورة أيضا:

- ❖ المعالجة الضوئية الديناميكية مرتين أسبوعيا لـ 12 أسبوع (113،114).
- ❖ المعالجة الكهربائية بالتيار الكهربائي المستمر بشدة 5-15 ميلي أمبير لمدة 10 دقائق والمطبق أسبوعيا لمدة 4-6 أسابيع (115).
- ❖ المعالجة بالليزر CO_2 بطاقة عظمى 100 واط وطول نبضة يتراوح بين 0.5-5 ثواني.

وصحيح أن هذه العلاجات قد تكون أقل تأثيرات جانبية من غيرها إلا أن كلفتها وندرة الدراسات المجراة عليها تحول دون شيوع استخدامها في الممارسة العملية.

1-1-14-1-3-المعالجة بالحقن الموضعي: وذلك بحقن1-2 مل من أملاح الأنتموان (البنتوستام Stipogluconate –Na أو الغلوغانتيم meglumine antimoniate) داخل الأدمة وتعتبر هذه الطريقة من أهم طرائق المعالجة الموضعية وينصح بها عندما تكون الآفات قليلة العدد حتى ولو كانت غنية بالطفيليات (116)، كما وتمتاز هذه الطريقة بالحصول على تراكيز عالية من أملاح الأنتموان في مكان الآفة مع تجنب تأثيراتها الجهازية الكثيرة .

هذا وقد تستجيب الليشمانية الناكسة لحقن البنتوستام داخل الآفة كما ويساعد حقن الستيروئيدات أيضا على الشفاء (116).

ومن المواد الأخرى التي يمكن حقنها موضعيا في آفات الليشمانية الجلدية المحلول المائي للميباكرين 10% أو الكلوروكين او الايمتين 20% ويكرر الحقن أسبوعيا حتى 6 أسابيع (114)، كذلك يمكن استخدام المحلول الملحي مفرط التوتر بتركيز 7% وبفواصل من 7-10 أيام لمدة 2-6 أسابيع وهذه طريقة آمنة ورخيصة (108).

سجلت فعالية الانترفيرون غاما IF-γ عند الحقن حول الآفة لكنه غالي الثمن (8)، كما يمكن حقن IL-2 ضمن الآفة وهو يعزز المناعة الخلوية (110).

1-1-14-1-4- المعالجة الموضعية بالرهيمات أوالمراهم: وتمتاز كونها سهلة الاستخدام وقليلة الكلفة ويمكن تطبيقها من قبل المريض ومنها الباروموميسين paromomycin بتركيز 15% والكيتوكونازول الموضعي 2% والميكونازول 2% والكلوتريمازول1%.

1-1-14-2- الطرائق الجراحية: باستئصال الآفة أو تجريفها واستخدام الطعوم والشرائح الجلدية وتحمل هذه الطرائق عموما خطر انتشار الطفيلي عبر الأوعية اللمفاوية ولا يوصى بها إلا أن المعالجة التصنيعية plastic تلعب دورا مهما في علاج الندبات المشوهة التي تتركها الليشمانية بعد شفائها .

1-1-14-3- المعالجة الجهازية: وهي الخيار العلاجي المستخدم في حالة الليشمانية المخاطية والحشوية، إضافة إلى حالات الليشمانية الجلدية التي تفشل فيها المعالجات الموضعية أو لا يكون بالإمكان تطبيقها .

1-1-14-3-1- أملاح الأنتموان: هناك مستحضران متوفران تجاريا لأملاح الانتموان خماسية التكافؤ هما :ن- ميتيل غلوكامين الانتموان أو ميغلومين الأنتموان واسمه التجاري غلوكانتيم Glucantime وستيبوغلوكونات الصوديوم واسمه التجاري بنتوستام Pentostam الذي يعطى بجرعة 10-20 ملغ/كغ/يوم عضليا أو وريديا، أما الغلوكانتيم فجرعته 40-60 ملغ/كغ/يوم لمدة 15-20 يوم ويمكن إعادة الجرعة بعد فاصل 14 يوم.

إن آلية تأثير هذه المركبات فهي غير واضحة تماما، فهي تثبط عدة أنزيمات في الطفيلي وبشكل خاص أنزيم فوسفوفركتوكيناز phosphofructokinase مما يؤدي إلى حصر إنتاج الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP وتثبيط انحلال الغلوكوز وتثبيط دورة حمض الليمون (110). أما التأثيرات الجانبية أهمها ألم مكان الحقن أعراض هضمية وعكة عامة والآم عضلية اضطرابات نظم ،ارتفاع خمائر الكبد، سمية كلوية، التهاب بنكرياس طفوح جلدية ونادرا صدمة تأقية.

1-1-14-3-2- الأمفوترسين B: وهو دواء معروف كمضاد للفطور وخاصة العميقة، لكنه يملك أيضا فعالية ضد الليشمانية وذلك بارتباطه بالستيرولات الغشائية للخلية كالأرغوستيرول مؤديا

إلى تسريب الشوارد عبر الغشاء وموت الطفيلي، ومن تأثيراته الجانبية السمية الكلوية اضطرابات الشوارد واللانظميات أما الجرعة فهي 0.5-1ملغ/كغ/كل يومين تسريبا وريديا.

1-1-14-3-3- البنتاميدين Pentamidine: وهو دواء يعطى لمعالجة داء المثقبيات الأفريقي كما أنه فعال ضد الليشمانية ويأتي بالمرتبة الثانية في علاج الليشمانية الجلدية بعد الأنتموان، ولكنه ذو تأثيرات جانبية كثيرة مثل التهاب البنكرياس و نقص البيض والصفيحات وهبوط ضغط واضطرابات في تخطيط القلب الكهربائي.

1-1-14-3-4- الميلتيفوزين: وهو الدواء الوحيد المثيت الغعالية الذي يعطى عن طريق الفم وقد تم ترخيصه لعلاج الليشمانية الحشوية في الهند وقد يصبح العلاج الأول لليشمانية في المستقبل القريب (117)، أهم تأثيراته الجانبية الغثيان والإقياء.

1-1-14-3-5- المعالجة بمضادات الملاريا: وينصح بإعطائها في الإصابات المنتشرة وفي الليشمانية الحشوية ومنها الكلوروكين والبيريميدين كما يمكن اعطاء الايمتين هيدروكلوريد، أهم التأثيرات الجانبية الخاصة بمضادات الملاريا هي الاضطرابات البصرية والعصبية المركزية بالإضافة للدوار، الإسهال والألم البطني (110).

ومن المعالجات الجهازية الأخرى الكيتوكونازول والايتراكونازول والفلوكونازول والازيترومايسين والريفامبيسين و الألوبرينول و الدابسون وسلفات الزنك و الباروميسين.

1-1-14-4- معالجات مناعية: وذلك باعطاء Interferon-gamma-lb (Actimmune) وحده أو مع مركبات الأنتموان (118)، كما يمكن استعمال IL-2 ضمن الآفة وهو يعزز المناعة الخلوية كما سبق وذكرنا (110).

1-1-15- اللقاح Vaccination:

لقد بذلت جهود كبيرة من أحل تطوير لقاح فعال ضد الليشمانية ولكن هذه الجهود مازالت حتى الآن غير مثمرة (119)، إن الطريقة الوحيدة في التمنيع التي أثبتت فعاليتها تقوم على حقن طفيليات حية كاملة الفوعة في الجلد (التطعيم الليشماني Leishmanization)، إلا أن هذه الطريقة غير عملية من عدة نواحي منها صعوبة الاحتفاظ بفوعة الطفيلي وخطر تطور آفات شديدة عند البعض ولذلك لا يوصى بها حاليا من قبل منظمة الصحة العالمية.

وخلال السنوات الماضية كان هناك محاولات عديدة لتطوير لقاح بدءا من طفيليات ميتة بمفردها أو مع إضافة مواد أخرى مستمنعة إلى اللقاح كالـ BCG لزيادة فعاليتها (120)، أو طفيليات حية مضعفة (121)، كما جربت لقاحات جزئية مكونة من مستضدات الليشمانية المحضرة بالتأشيب الوراثي (122)، ولكن جميع هذه اللقاحات فشلت في إعطاء حماية طويلة الأمد من المرض.

1-1-16- الوقاية Prevention:

تهدف الإجراءات الوقائية إلى كسر حلقة انتقال الطفيلي، فمن أجل السيطرة الفعالة على المرض يجب فهم وبائيات المرض ومعرفة بيئة الناقل، وكذلك معرفة المستودع انساني أم حيواني، وتتضمن الوقاية الإجراءات التالية:

1-1-16-1- السيطرة على مستودعات الطفيلي: وهي من أهم وسائل الحد من انتشار المرض، وتتم بكشف الإصابات ومعالجتها عند البشر، وتغطية الآفات الجلدية لمنع وصول الفواصد إليها، أما بالنسبة للمستودعات الحيوانية فيجب كشف الإصابة عند الكلاب الأليفة ومعالجتها، ومكافحة الكلاب الشاردة، ومكافحة القوارض والقضاء عليها وذلك بحرث التربة بشكل عميق لتدمير الحجور، ووضع السموم بجانب حجورها (123).

1-1-16-2- السيطرة على الناقل: من خلال تخريب البيئة المناسبة لحياتها وتكاثرها، وذلك بتأمين صرف صحي جيد، وإزالة النفايات والفضلات العضوية حول المنازل، وتحسين الصحة العامة، ورش المبيدات الحشرية وفق برامج خاصة تشرف عليها الدولة.

1-1-16-3- الوقاية الشخصية: وذلك بارتداء الملابس ذات الكم الطويل خاصة أثناء النوم، واستخدام المنفرات الحشرية repellent على مناطق المكشوفة وتغطية النوافذ (124)، واستخدام الشبكات المشبعة بمواد قاتلة للحشرات كتلك المعالجة بالبيريتروئيد Pyrethroid-Threated bednet (125).

1-1-16-4- تحسين مقاومة ومناعة الثوي باللقاح في حال توافره.

2-1- التعدد الشكلي

1-2-1- مفهوم التعدد الشكلي _Definition of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

هو اختلاف في تسلسل الــDNA الناجم عن اختلاف وحيد في الأسس الآزوتية (الأدنين والتايمين والسيتوزين والغوانين A,T,C,G) في المجين وذلك بين مجموعة من الأنواع أو بين زوج صبغي في فرد، كما أن البعض يطلق تعبير الـSNP على موقع هذا الاختلاف، فعلى سبيل المثال قطعتين من الـ DNA AAGCCTA، AAGCTTA تتضمن اختلاف في نكليوتيد واحد وفي هذه الحالة (هنا) نقول بوجود أليلان C وT (126).

والأليل Allele كلمة مشتقة من اللغة اليونانية وتعني كل واحد وكتعريف هو فرد من زوج أو سلسلة أشكال مختلفة من المورثة، ويفهم الأليل على أنه سلسلة بديلة من الـ DNA في نفس موقع المورثة الذي يمكن أن يقود أو لا يقود إلى سمة ظاهرية، وفي أي كائن ذو صيغة ثنائية مع نسختين من كل صبغي يتألف **النمط الجيني** genotype لكل مورثة من أليلين يتواجدان بذلك الموقع، ويكونان متماثلين عند متماثلي اللواقح، ومختلفين عند متغايري اللواقح وبشكل طبيعي وبالعودة للمثال السابق يكون النمط الوراثي في ذلك الموقع CC,TT,CT.

ويعرف **تواتر الأليل** Allele frequency بأنه قياس للتواتر النسبي للأليل في موضع مورثي في جمهرة وعادة ما يعبر عنه بشكل تناسب أو نسبة مئوية، أما أليل **النمط البري** wild type هو الأليل الذي يعتبر الأليل الطبيعي للكائن ويشير إلى النمط الظاهري للشكل النموذجي للأنواع كما تحدث في الطبيعة، ويخيل أن النمط البري هو نتاج الأليل الطبيعي المعياري في موقع ما على النقيض من **الأليل الطافر** mutant allele الذي عادة ما يكون تعديل (تكيف) جديد نسبيا ويقدر أن أغلب أو كل المواقع الجينية تتواجد بشكل ضروب مختلفة الآلائل، والتي تختلف بتواترها في كل مكان باختلاف المناطق الجغرافية للأنواع، عندها لم يعد للنمط البري الموحد وجود.

ينسب إلى الـSNP **الأليل الأصغر** minor allele في موقع ما في جمهرة معينة وبمعنى آخر هوالأليل ذو التواتر الأدنى في الـ SNP وبناء عليه يوجد اختلاف بين الجمهرات البشرية وبذلك فإن أليل SNP الشائع في مجموعة جغرافية أو عرقية معينة يمكن أن يكون أقل ندرة في مجموعة أخرى .

أطلق في السابق على الـSNPs ذو الأليل الصغير الذي تواتره يساوي أو أكبر من 1% اسم الـ SNP، والبعض أيضا استخدم تعبير **الطفرة** mutation للدلالة على التغيرات أو الاختلافات

التي تحمل تواتر أليل منخفض، ولكن بفهم أفضل للتطور لم يعد استخدام وصف كهذا ضروريا، على سبيل المثالdbSNP هي قاعدة بيانات من المركز العالمي لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية NCBI تتضمن الـSNPs والتي تواتر أليليها الأصغري أكبر أو يساوي 1%.

يشير التعبير haplotype وهو اختصار لـ haploid genotype أي **النمط الفرداني** وهو مجموعة من الآلائل في مواقع عديدة والتي تنتقل مع بعضها على نفس الصبغي وقد يشير النمط الفرداني إلى موضعين وحتى الصبغي كاملا وذلك بناء على حوادث التأشيب recombination الحاصلة بين مجموعة من المواقع، وبتعبير آخر النمط الفرداني هو مجموعة من (SNPs) التي تترافق مع بعضها إحصائيا (127).

يتأثر تواتر الأليل والنمط الفرداني بالعمليات التي تحدث على مستوى الخلية كالطفرات والتأشب والانقلاب الجيني gene conversion، بالإضافة للعمليات على مستوى الجمهرة كالانتقاء الطبيعي natural selection ضد الآلائل التي تسهم بحدوث المرض فعندما تكون المورثات قريبة من بعضها فإن الانتقاء الذي يغير تواتر الأليل في الموقع الأول يؤدي إلى تغير مماثل في تواتر الآلائل في مواقع أخرى في نفس النمط الفرداني (127).

نذكر من المفاهيم الهامة في هذا المجال أيضا **اختلال التوازن الارتباطي** (LD) linkage disequilibrium وهو الارتباط غير العشوائي للآلائل في موضعين أو أكثر، ويصف الحالة التي يكون فيها بعض الآلائل أو المشعرات الجينية أكثر أو أقل تكرارا من المتوقع للبنية (التركيبة) العشوائية للأنماط الفردانية بالاعتماد على تكراراتها، ويقاس الارتباط غير العشوائي بين التعددات الشكلية في مواقع مختلفة بدرجة الـ LD، وهو عدديا الفرق بين القيمة الملاحظة و المتوقعة لتكرارت الالائل أو الأنماط الفردانية بافتراض التوزع العشوائي لها، تتأثر درجة الـ LD بعدد من العوامل متضمنة الارتباط الجيني، الانتقاء، درجة التأشب، الطفرات، الانزياح الجيني وتركيبة الجمهرة.

تقاس درجة الـ LD **بمعامل LD** (LD coefficient) أو ما يسمى 'D حيث تشير قيمة 'D المساوية للصفر أن الموقعين مستقلين عن بعضهما، بينما قيمة 'D المساوية للواحد تشير للتبعية أو سيطرة أحد الموقعين على الآخر، وأن التعدد الشكلي SNPs في الموقعين لن ينفصلا عن بعضهما بالتأشب، وإذا كان تواترا الأليلين متشابهين فإن 'D العالية تشير إلى أنه بإمكان أحد المشعرين أن يعمل كبديلا عن الآخر في الدراسات الجينية، وهكذا تشير هذه الظاهرة أن الآلائل القريبة من بعضها في الجينوم تميل لأن تورث مع بعضها، تشير قيمة D'<1 إلى أن أسلاف الـLD تعطلت أو تقاطعت خلال تاريخ الجمهرة، وبالنتيجة قيمة 'D القريبة من الواحد فقط هي

قياس موثوق للـ'D لحد ما بينما يصعب تفسير قيم 'D الأدنى كون قيمة 'D تعتمد على حجم العينة أيضا (128)، بينما يقيس لغاريتم نسبة الأرجحية LOD log of the likelihood odds ratio موثوقية قيمة 'D فعندما تكون **(**D'=1 و LOD≥2**)** بين موقعين يعني درجة عالية من الارتباط، بينما تشير قيم (D'=1 و LOD<2) إلى درجة أقل من الارتباط، أما قيم (LOD<2 و D'<1) فتشير إلى درجة منخفضة جدا من الارتباط.

كما يقيس **معامل الارتباط** correlation coefficient r^2 أيضا LD بين مؤشرين جينيين، فالـ SNPs الغير مفصولة عن بعضها بالتأشب أو التي لديها نفس تواتر الأليل (LD تام) تكون r^2=1 مما يعني أن الموقعين يزودان بنفس المعلومات ويقال بهذه الحالة أن الـ SNPs مزيدة أو مطنبة redundant، وتشير قيم r^2 الأدنى من ذلك إلى درجة أقل من LD.

1-2-2- أنماط التعدد الشكلي Types of SNP:

1-2-2-1- التعدد الشكلي في المناطق غير المرمزة non-coding region.

1-2-2-1- التعدد الشكلي في المناطق المرمزة coding region وتضم:

1-2-2-1- 1- المرادفة synonymous وتشير إلى الـSNP أو الطفرة التي يقود فيها كلا الشكلين إلى نفس السلسة الببتيدية و تسمى أحيانا الطفرة الصامتة silent mutation.

1-2-2-1- 2- غير المرادفة nonsynonymous والتي تقود إلى إنتاج سلسلة ببتدية مختلفة، وقد تكون مغلوطة المعنى (طفرة مغلطة) missense التي تؤدي إلى حمض أميني مختلف أو طفرة هرائية nonsense تؤدي إلى رامزة توقف stop codon مبكرة (سابقة لأوانها).

إذا قد يحدث التعدد الشكلي في المناطق المترجمة أو غير المترجمة من الجينات أو المناطق البينية بين الجينات intergenic regions كما أنه ليس من الضروري أن يحدث SNPs في المناطق المترجمة من المورثات تغيرات في تسلسل الحموض الأمينية في البروتين الذي ينتج بسبب تنكس degeneracy في الشيفرة الوراثية وبالتالي يكون الـSNPs في غير المناطق المرمزة للبروتين لها نتائج على تَضْفير المورثة gene splicing أو ربط عوامل الانتساخ أو تسلسل الـRNA غير المرمز (127).

1-2-3- أهمية وفائدة التعدد الشكلي Use and importance of SNPs :

يمكن أن يؤثر الاختلاف في تسلسل الـ DNA عند الانسان على كيفية تطور الأمراض والاستجابة للعوامل الممرضة والمواد الكيميائية والعقاقير واللقاحات وعناصر أخرى (129)،

كما يمكن أن يكون مفتاح يخول إدراك مفهوم الطب المطبوع بطابع شخصي personalized medicine، وعلى أي حال ذو أهمية كبرى في أبحاث الطب البيولوجي لمقارنة مناطق من المجين بين المجموعات (مثلا تلك المصابة بمرض وأخرى سليمة) (130)، ويعتقد أن هذا الترابط وتحديد الآلائل لمجموعة النمط الفرداني يمكن أن يحدد وبشكل واضح المواقع العديدة الأشكال الأخرى في أماكنها وقد تكون معلومات كهذه عالية القيمة لاستقصاء الوراثة خلف الأمراض الشائعة (129) .

أكتشف حتى الآن أكثر من 2.4 مليون تغير نوكليوتيدي وحيد (SNP) في DNA الجينوم البشري وما تزال الملايين تنتظر الاكتشاف، ستكون هذه التغيرات مفيدة في اكتشاف المورثات ذات العلاقة بالصحة أو بالأمراض وهذا سوف يسمح بفهم أفضل لتطور المرض، ففي بعض الأمراض ذات الأساس الجيني الصريح نسبيا يعد الاضطرابات أحادية الجين single-gene disorders كافية لاكتشاف المورثات المسببة ولكن معظم الأشخاص الذين ليس لديهم اضطرابات أحادية الجين ولكن يطورون أمراضا شائعة كأمراض القلب والسكري والأورام والاضطرابات النفسية، هذه الأمراض التي تتأثر بعوامل مورثية وبيئية ما تزال مشاركة المورثات فيها غير واضحة ولكن العديد من الباحثين يعتقدون بوجود عدة متغيرات مشتركة مهمة (نظرية أمراض مشتركة،متغيرات مشتركة) (130،129).

تشكل بعض الـSNP متغيرات أساسية وظيفية و تعتبر عوامل خطورة في حدوث المرض، فالأشخاص اللذين لديهم هكذا آلائل لديهم خطورة أعلى لحدوث المرض من الأشخاص اللذين ليس لديهم مثل هذه المتغيرات، معظم الـ SNPs ليست متغيرات وظيفية ولكنها مهمة كمشعر بوجودها لاكتشاف المناطق ذات الجينات التي تسهم في حدوث المرض، لذلك تقارن العديد من الآلائل بين المرضى والشواهد وعندما تكون منطقة خاصة لها SNP أكثر تواترا عند المرضى منه عند الأصحاء عندها تعتبر هذه الـSNPs وآلائلها مرافقة للمرض هذه المشاركة أو الارتباط بين الـSNP والمرض يشير إلى أنه من الممكن أن يكون هناك جينات في تلك المنطقة تساهم بحدوث المرض (130،129).

1-3- الفيكولينات

1-3-1- مقدمة حول الفيكولينات:

الفيكولينات Ficolins هي عائلة من البروتينات المنحلة و التي تشكل جزء من المناعة الطبيعية بعملها كجزيئات تعرف recognition molecules في نظام المتممة (131).

بداية عرف الفيكولين كبروتين رابط لعامل النمو -transforming growth factor (TGF) b1-binding protein على غشاء باطن الرحم عند الخنزير (132)، وذلك على الرغم من أن آلية الارتباط الفيزيولوجية بـTGF-b1 ونتيجته ما تزال مجهولة، وأخذت اسمها ficolins من ملامحها (بنيتها) الفريدة المؤلفة من وحدات شبيهة بالفيبرونوحين وأخرى شبيهة بالكولاجين (133).

عزل المرادف البشري من البلازما من وحدة 35 kDa تشير إلى35 protein (P35) وثم سمي L-ficolin (FCN-2) وحدد تسلسله (134)، ثم عزل الفيكولين البشري M-ficolin (FCN-1) من الـ DNA الجينومي والـ DNA المستنسخ cloning DNA (cDNA) وذلك باستنساخ عديدات النوكليوتيد التي ترمز لجزيء يشبه L-ficolin وسمي P35-related protein (135،136).

بينما كشف الفيكولين FCN-3 (H-ficolin) في مصل مرضى الذئبة الحمامية الجهازية systemic lupus erythematosus وحدد بوجود أضداد ذاتية عند هؤلاء المرضى وسمي بالاسم القديم للمدينة التي كشف فيها هذا المستضد Hakata (137)، وبقي حتى سنة 1998 حيث حددت مواصفاته وتم استنساخه (138)، على الرغم من أن المؤشرات الأولية بوجوده كانت قبل ذلك بكثير (139).

كشف الفيكولين بالإضافة للانسان عند عدد من الفقاريات منها الجرذان (140،141)، وأيضا الخنازير (142)، والقنافذ hedgehogs (143)، والقيطم xenopus (من البرمائيات) (144)، وعند اللافقاريات كالحلزون ascidians (145).

1-3-2- بنية الفيكولينات Ficolins structure:

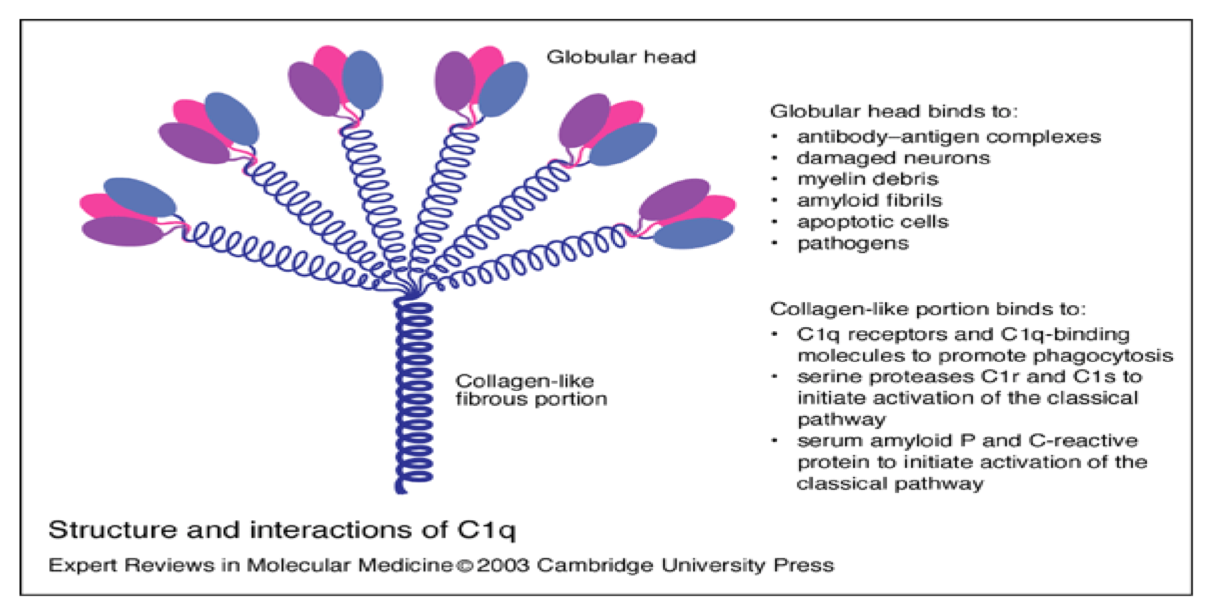
تتشابه بنية الفيكولين مع الجزء C1q من المتممة واللكتين الرابط للمانوز Mannose- (MBL) binding lectin (131) (الشكل 24)، إذ تتألف الوحيدة subunit في الجزء C1q من 3 سلاسل ببتيدية مختلفة A,B,C مشكلة البنية التركيبية وكل سلسلة لها نوعية مختلفة تتألف من منطقة شبيهة بالكولاجين collagen-like region ونهاية C هي وحدات التعرف (ميدان التعرف) C-terminal recognition domain (الشكل 25) (146).

C1q + C1r and C1s = C1

MBL + MASP = MBL-MASP

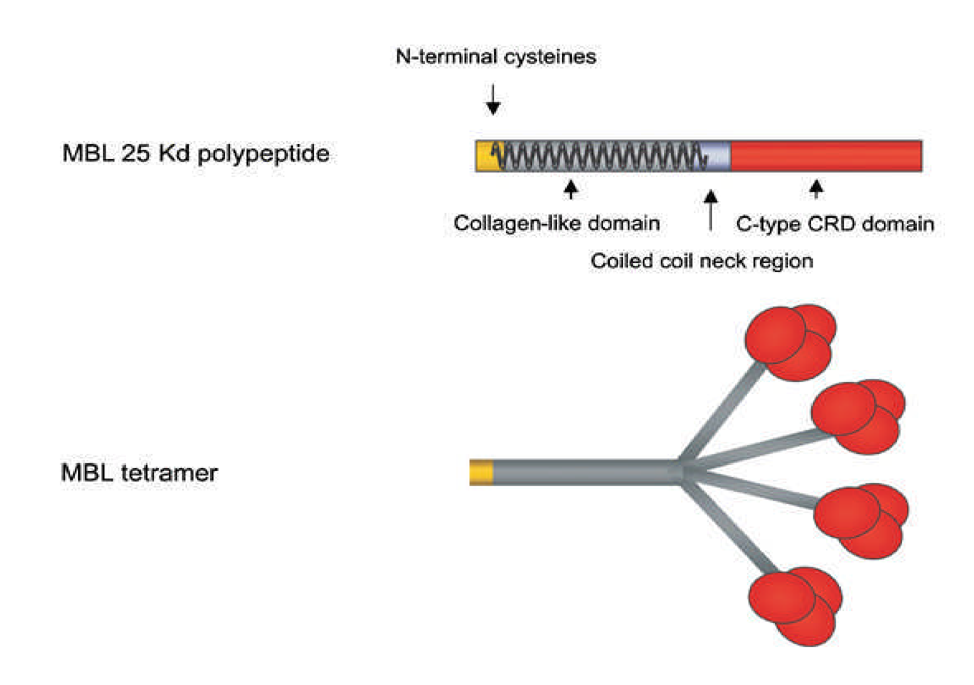
Ficolin + MASP = Ficolin-MASP

الشكل (24) التشابه بين بنية الفيكولين والـC1q من المتممة والـ MBL.



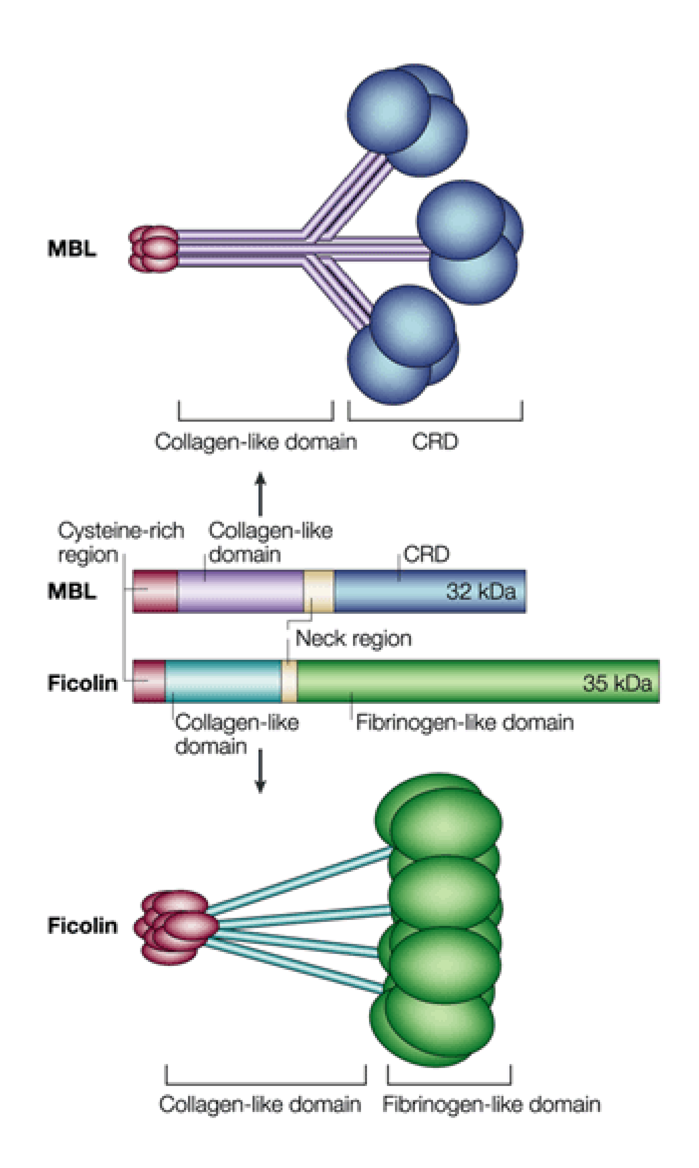
الشكل (25) بنية وارتباطات الجزء C1q من المتممة (146).

تتألف الوحيدة وهي البنية التركيبية للـ MBL من 3 سلاسل متماثلة تحوي كل منها منطقة شبيهة بالكولاجين، ووحدات تمييز للكربوهيدرات (ميدان تعرف السكريات) معتمدة على الكالسيوم (الشكل 26)، وبشكل مفصل أكثر تتألف كل سلسلة من سلاسل الـ MBL من نهاية N غنية بالسيستئين، ووحدات شبيهة بالكولاحين، ومنطقة رقبة ونهاية C وهي وحدات تمييز للكربوهيدرات وتتشكل البنية قليلة الأقسام oligomer بواسطة الروابط المتصالبة بين الوحيدات عبر الجسور الكبريتية في النهاية N (147،148).



الشكل (26) بنية البروتين الرابط للمانوز MBL (147).

أما الفيكولين فتتألف الوحيدة من 3 سلاسل ببتيدية متماثلة تحوي وحدات شبيهة بالفيبرونوجين بشكل رأس مؤلف من تجمعا (عنقودا) كرويا بينما يتألف الذيل من وحدات شبيهة بالكولاجين، تتجمع مجموعة الأجزاء قليلة القسيمات لتشكل البنية الوظيفية للفيكولين (الشكل27) (134).



الشكل (27) مقارنة بين بنية الفيكولين والبروتين الرابط للمانوز (149).

وبشكل مفصل أكثر الفيكولين في بنيته النموذجية هي بنية رباعية تتألف من اجتماع 4 وحيدات تتضمن كل منها 3 سلاسل ببتيدية (أي أن الشكل الفعال هو 12 جزء) (الشكل 28).

تتألف السلسلة الببتيدية في الفيكولين بالتفصيل من الأجزاء التالية :

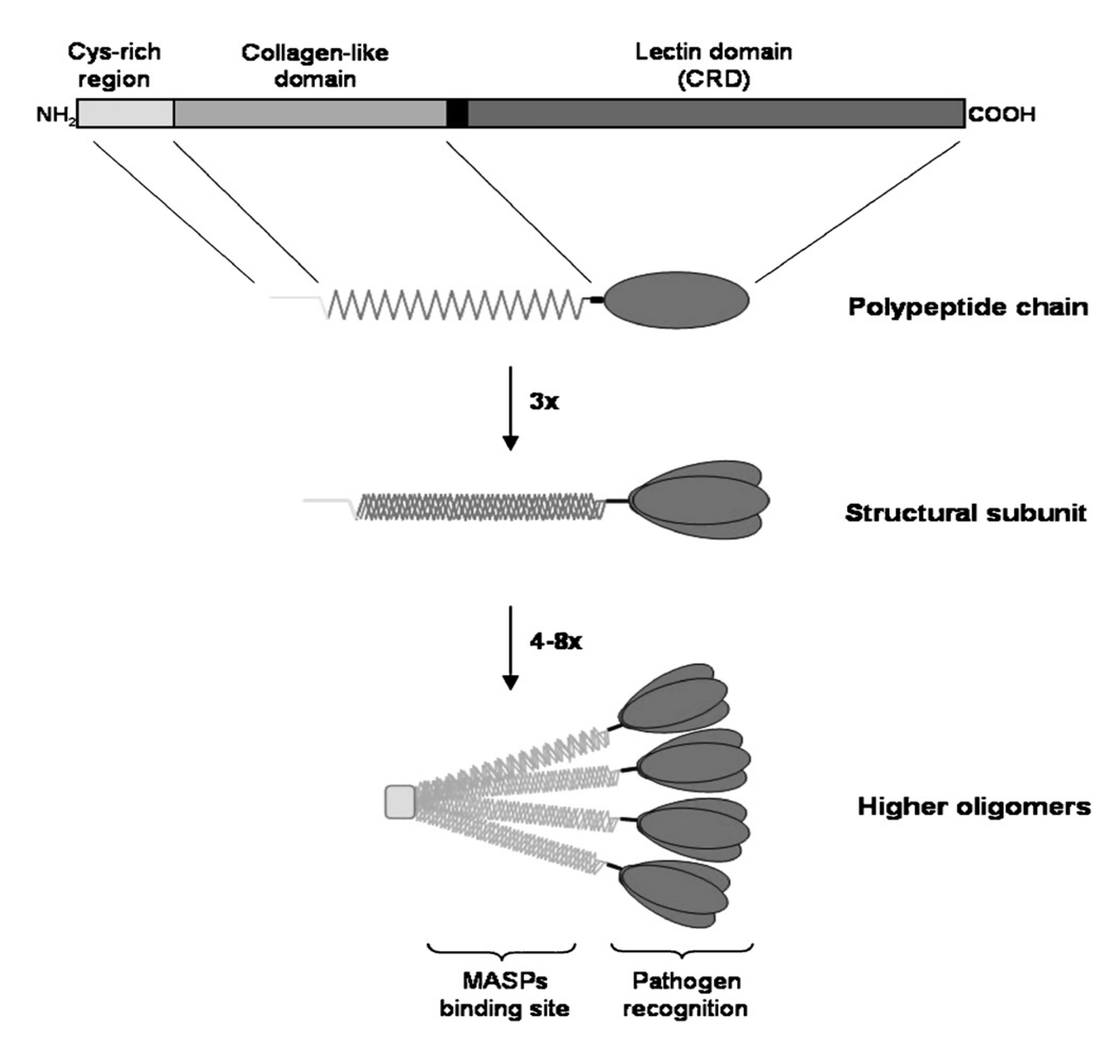
1- نهائية صغيرة N NH2-terminal تتصف بمنطقة تحوي ثمالات residues السيستيئين (نهاية N غنية بالسيستئين) والتي تشكل روابط ثنائية الكبريت متصالبة (الجسور الكبرينية) مع السلاسل الأخرى لتشكيل البنية الرباعية وذلك باجتماع الأشكال الثلاثية trimer (مثلوث) إلى شكل عديد القسيمات يشبه العنقود (134).

2- وحدات شبيهة بالكولاجين مسؤولة عن ارتباطه بالإنزيمات Mannose associated (MASP) serine protease تضم كل سلسلة 11-19 تكرار من الثلاثية (Gly-Xaa-Yaa)

حيث يشير y،x إلى حموض أمينية مختلفة وعبر هذه الوحدات تتجمع السلاسل الببتيدية الثلاثة في الشكل المثلوث مشكلة وحيدة.

3- منطقة الرقبة وهي قصيرة بالمقارنة مع MBL.

4- نهاية COOH -terminus C وهي وحدات شبيهة بالفيبرونوجين التي تشبه النهاية C من سلاسل بتا أو غاما للفيبرونوجين (النهاية C الكروية الفيبرونوجينية) والتي ترتبط بالبنية الهدف. هذا وإن البنية المتعددة الأقسام للفيكولين تضمن ولع النهاية الفيبرونوجينية بالكربوهيدرات على سطح العوامل الممرضة ويتم صيانة البنية المتعددة الأقسام هذه كما أشرنا بواسطة الروابط ثنائية الكبريت في النهاية N هذه الروابط التي تجمع الوحيدات الأربعة لتشكل الشكل الفعال الذي يشبه الباقة (الشكل 28) (150،151،152).



الشكل (28) البنية التفصيلية للفيكولين (153).

هذا وتتشابه بنية الفيكولين 1 مع الفيكولين 2، إذ أن وزن الوحيدة في الفيكولين1و2 هو 35 كيلو دالتون، كما أن كليهما ذو بنية رباعية، أما على مستوى الحموض الأمينية فيبلغ التشابه 79% ويرتفع إلى 85% إذا قورنت الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين بمفردها، ولكن عدد تكرارات (Gly-Xaa-Yaa) في الوحدات الشبيهة بالكولاجين في الفيكولين الثاني هو 15 ويرتفع إلى 19 في الفيكولين الأول بسبب وجود اكزون إضافي (150،151)، بينما للفيكولين 3 بنية سداسية بالمجهر الالكتروني (138)، ويبلغ وزن تحت وحدته 34 كيلو دالتون أما عدد تكرارات (Gly-Xaa-Yaa) فهي 11 ومع ذلك يتشابه الفيكولين 3 مع 1 و2 بنسبة 45% وترتفع النسبة إلى 58% في حال مقارنة الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين بمفردها .

أما فيما يتعلق بعدد الحموض الأمينية، يضم بروتين الفيكولين1 326، و الفيكولين2 313، أما الفيكولين3 فيضم 299 حمضا أمينيا (الجدول 3).

نوع الفيكولين	عدد الحموض الأمينية	المعالجة الجزيئية		المناطق	
		الببتيد الاشعاري	السلسلة	الوحدات الشبيهة بالكولاجين	الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين
M-ficolin (FCN-1)	326	من (1-29) = 29	من (30-326) =297	من (55-93) =39	من (109-326) =218
L-ficolin (FCN-2)	313	من (1-25) = 25	من (26-313) =288	من (51-92) =42	من (96-313) =218
H-ficolin (FCN-3)	299	من (1-23) = 23	من (24-299) =276	من (48-80) =33	من (84-299) =216

الجدول (3) مقارنة بنية الفيكولينات الثلاثة (131).

1-3-3- جينة الفيكولينات Ficolins Genes:

عزل عند الانسان 3 جينات للفيكولين FCN1, FCN2 ,FCN3 والتي ترمز لـ

Ficolin-1 (المرادف لـ ficolin-M أو Ficolin/P35-related protein)

Ficolin-2 (المرادف لـ L-ficolin أو Hucolin أوFicolin/P35)

Ficolin-3 (المرادف للـH-ficolin أو Hakata antigen أوالبروتين السكري العطوب بالحرارةß2 thermolabile ß2-macroglycoprotein)

تتوضع جينة (مورثة) الـ FCN1 و FCN2 على الصبغى التاسع في الموقع 9q34 بينما ينسب الـ FCN3 للصبغي الأول في الموقع (1p36.11) (138،135) (الجدول 4).

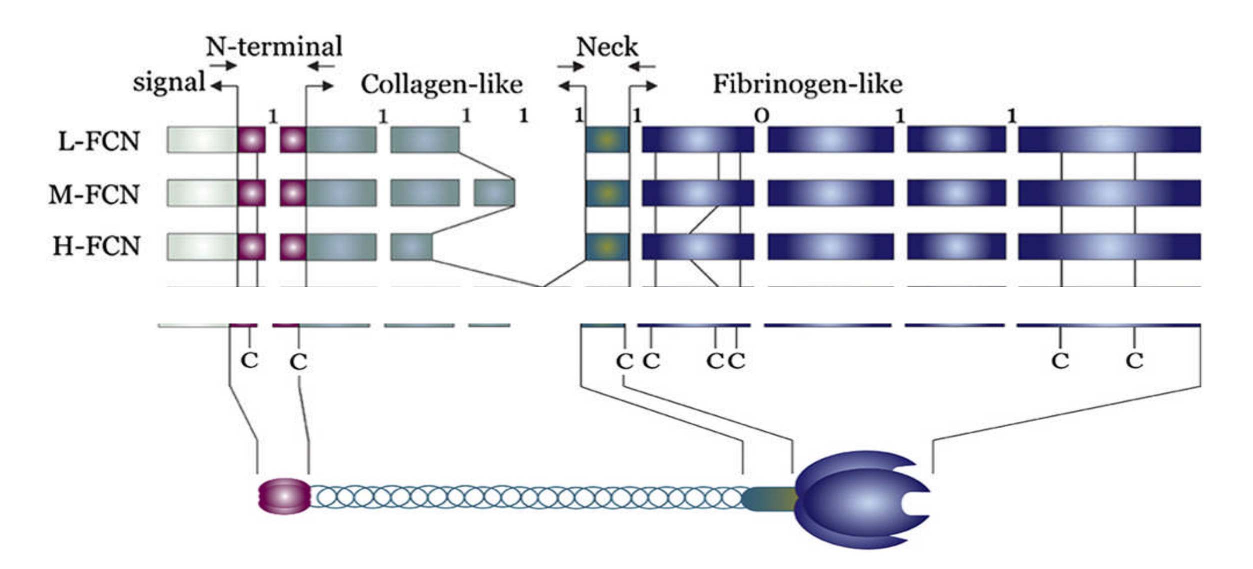
تضم مورثة الـ FCN1 9 اكزونات بينما تضم مورثة الـ FCN3 8 اكزونات.

الفيكولين	المورثة		البروتين					
	الموقع	أماكن التعبير عن mRNA	وزن الوحيدة (kDa)	عدد الأجزاء (mer)	أماكن تواجده	عدد تكرارات الـ Gly-Xaa-Yaa	الوظيفة
(FCN-1)	9q34	الكريات البيض (وحيدات النوى المحيطية)	35	12	سطح وحيدات النوى	19	مستقبل بلعمي+ تفعيل المتممة
(FCN-2)	9q34	الكبد	35	12	البلازما	15	تفعيل المتممة+ الطهي
(FCN-3)	1p36.11	الكبد الرئتين	34	18	البلازما	11	تفعيل المتممة+ الطهي

الجدول (4) أهم مواصفات جينة الفيكولينات والبروتينات الناجمة عنها (131).

تتألف جينة الـفيكولين 2 من 8 اكزونات يرمز الاكزون الأول للنهاية 5 غير المترجمة-the 5_ untranslated region (5_-UTR), وببتيد مفرد leading peptide بالإضافة لبعض الحموض الأمينية في النهاية N وعددها 9، ويرمز الاكزونين الثاني والثالث للوحدات الشبيهة بالكولاجين، بينما يرمز الاكزون الرابع لمنطقة الرقبة التي تسبق الوحدات الفيبرونوجينية الكروية التي ترمز أيضا بالاكزونات من (5-8)، كما يرمز الاكزون الثامن أيضا للمنطقة غير المترجمة (UTR-_5) بالإضافة لما تبقى من النهاية الفيبرنوجينية (133).

تضم مورثة الفيكولين 1 اكزون إضافي يرمز لقطعة إضافية هي 4 تكرارت إضافية من الثلاثية Gly-Xaa-Yaa في الوحدات الشبيهة بالكولاجين، وبسبب التشابه بين الفيكولين 1و2 في التسلسل البدئي، موقع المورثة و تنظيم الاكزونات يعتقد أن المورثتين تنجمان عن تضاعف مورثي (154).



الشكل (29) تنظيم جينة الفيكولين وترميزها للبروتين تشير الأرقام (1،0) إلى أطوار انغراز الانترون بينما يشير الحرف C إلى ثمالات السيستئين المصانة.(155).

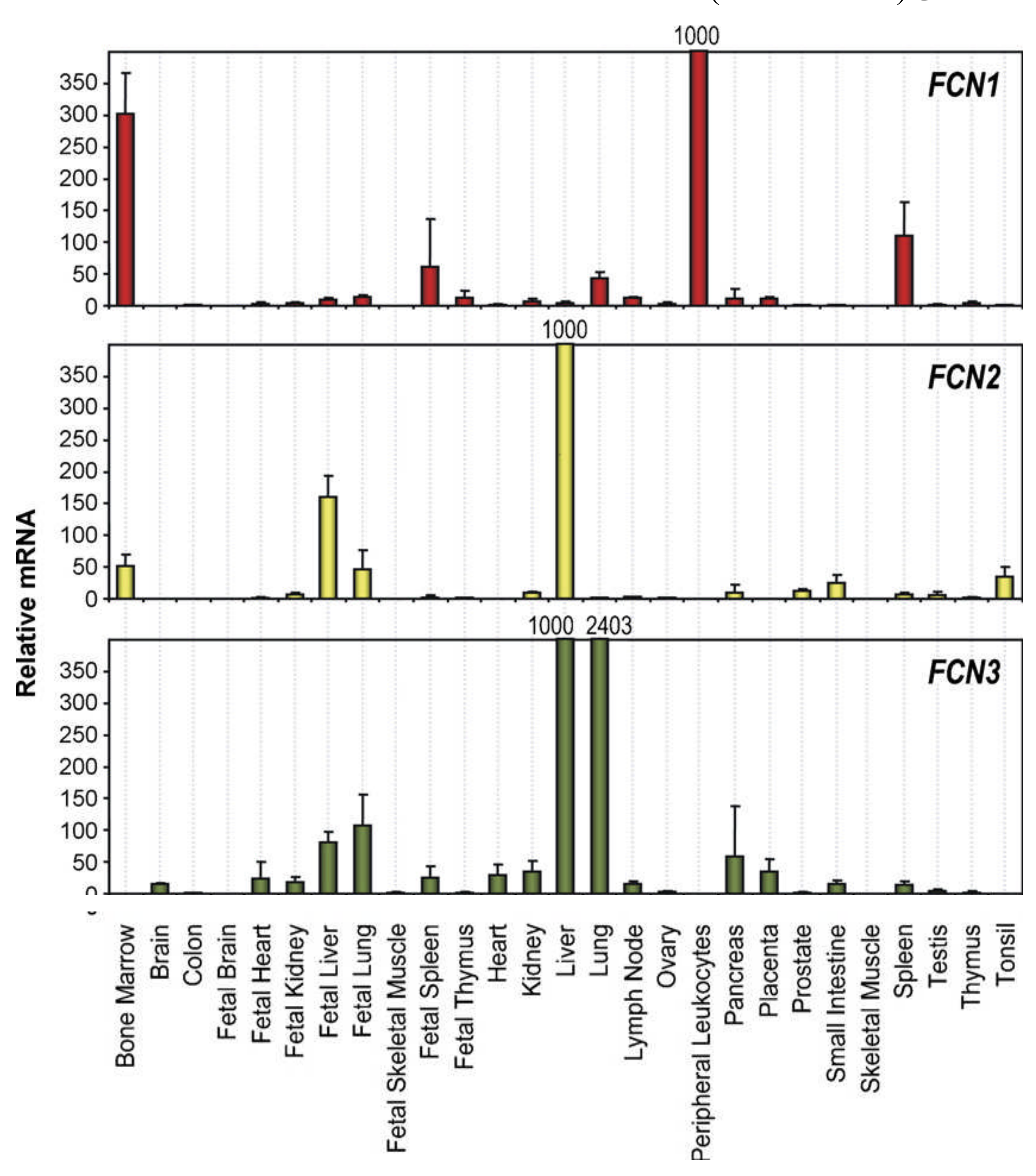
1-3-4- أماكن التعبير Sites of ficolin expression :

يعبر عن الفيكولين 1 بشكل أساسي في وحيدات الدم المحيطية ونقي العظام، والقليل منه في الطحال و الخلايا السنخية من النمط الثاني type II alveolar في الرئتين (136،135،156،157)، وقد أثبت وجوده على سطح الخلايا وحيدات النوى وبذلك يكون درجة التعبير عن الفيكولين 1 ترتبط بنضج وحيدات النوى إلى بالعات، وبالتالي فإن البعض يقدر مستواه المصلي بين (0.04–0.11) ميكروغرام/ مل أي وسطيا 0.06 (158) والبعض الآخر يقدره بين (0.28–4) ميكروغرام/مل أي وسطيا 1ميكروغرام/ مل (159).

يعبر عن الفيكولين 2 بشكل أساسي في الكبد (152،135)، ووجدت كميات قليلة من mRNA الفيكولين 2 في نقي العظام واللوزات والأمعاء (160،157)، ولكن لم يعرف حتى الآن إن كانت نماذج التعبير هذه يتم ترجمتها لتركيب هذا البروتين (157)، يتراوح تركيز الفيكولين 2 من 1-12 ميكروغرام/مل وأغلب القيم بين (3-6) ميكروغرام/مل (161-163).

يعبر عن الفيكولين 3 في الكبد والرئتين، إذ يتم التعبير عنه في الكبد من قبل الخلايا الكبدية وخلايا القناة الصفراوية ويفرز منها إلى القناة الصفراوية والدوران، أما في الرئتين فتقوم بهذه المهمة خلايا ظهارة القصبات المهدبة والخلايا السنخية الظهارية من النمط الثاني ويفرز منها إلى لمعة القصبات والمسافات السنخية، كما يعبر عنه أيضا بكميات قليلة في القلب والكلية والبنكرياس والطحال والمشيمة، وكشف الـmRNA الخاص به بكميات قليلة في الدماغ (165،157،160،164)، أما تركيزه فيتراوح من (3-54) ميكروغرام/ مل والوسطي 25 ميكروغرام/مل (166).

يتواجد الفيكولين 2 والفيكولين 3 في المصل ويظهران اختلاف بتراكيزهما المصلية بين الأشخاص (167،134،162).



الشكل (30) التوزع النسيجي للفيكولينات (أماكن التعبير الأساسي للفيكولين 1 هي الكريات البيضاء المحيطية وكميات قليلة في نقي العظم والطحال، بينما يعبر عن الفيكولين 2 في الكبد والفيكولين 3 في الرئة والكبد (157).

1-3-5-ارتباطات (تفاعلات أو تآزرات) الفيكولينات Interaction of ficolins:

يمكن لكل أنواع الفيكولينات أن ترتبط عبر النهاية الفيبرونوجينية بمجموعة الأسيتيل سواء من الكربوهيدرات مثل N-أسيتيل غلوكوز أمين GlcNAc، أو N-أسيتيل غالاكتوز أمين

GalNAc، أو مع مركبات أخرى مثل N-acetyl-glycine، أو مركبات صنعية تتضمن الأسيتيل مثل acetylated albumins و acetylated LDL ولكن بدرجات مختلفة فيما بينها.
وبناء عليه يرتبط الفيكولين 1 مع N– أسيتيل غلوكوز أمين للإشريكية القولونية Escherichia coli (156)، كما أنه يستطيع طهي العنقودية الذهبية Staphylococcus aureus بتفاعله معها بروابط غير معروفة، بالإضافة لذلك يرتبط الفيكولين1 أيضا بالسلالات ذات النمط الناعم (LT2) من السالمونيلا الفأرية (S. typhimurium)، بينما لا يرتبط بالسلالات ذات النمط الخشن TV119 (168) على النقيض تماما من الفيكولين 2 مما يشير إلى اختلاف طيف العوامل الممرضة التي تميزها الفيكولينات (134).

تشمل روابط الفيكولين 2 بالإضافة لـ GlcNAc,GalNAc الـ N-acetyl- mannosamine وأيضا مجموعة الأسيتيل على السيستئين و الغلايسين (169)، وبذلك يستطيع سريريا تمييز عوامل ممرضة هامة كما يعمل على طهيها مثل السالمونيلا الفأرية ذات النمط الخشن TV119 والعنقوديات المذهبة و العقديات الرئوية (S. pneumoniae) والإشريكية القولونية.

اقترحت الدراسات أن الفيكولين2 مصمم للارتباط بالكربوهيدرات الطويلة التي تحوي ثمالات محايدة وثمالات الأسيتيل، ومثال على هذا الارتباط الخاص هو ارتباط الفيكولين 2 مع الليبوتكويك أسيد lipoteichoic acid (LTA) البنية الأساسية في جدار الجراثيم ايجابية الغرام (170)، الذي هو أيضا جزيء مطول يضم جزيئات الـGlcNAc أي روابط (b-1-3 link) بين حلقات الغلوكوز والغالاكتوز(171).

كما يبدو أن الفيكولين 2 متورط في البلعمة المتواسطة بالطهي للعقديات group B III streptococci (172) حيث أن محفظة الأخيرة ذات بنية مطولة التي تضم ثمالات الـ GlcNAc ليس في الموضع النهائي وحسب ولكنه أيضا روابط (b-1-3 , b-1-4 link) مختلفة بين حلقات الغلوكوز والغالاكتوز β-(1-3)-D-glucan (150).

وكغيره من بروتينات تمييز الغلوكان الأخرى 1,3-b-D glucan-recognizing proteins ، من المرجح أن الفيكولين 2 يرتبط أيضا بكربوهيدرات مطولة تحوي أسيتيل وجذور حيادية مثل الـ1,3-b-D glucan الموجود في جدر الخمائر والفطور وسطوح بعض الجراثيم والخلايا الميتة (172،173)، والأبعد من ذلك أن ارتباط الفيكولين 2 بالـ1,3-b-D-glucan لا يتضمن مجموعات الهيدروكسيل C4 للغلوكان، وهكذا يمكن أن يستوفى تفاعل مماثل بين الفيكولين2 والمحددات عديدة السكريد poly-1,3-b-D-galactosyl polysaccharide determinants والذي هو على سبيل المثال عامل فوعة طفيلي الليشمانية الكبيرة (174)، كما تشير الدراسات

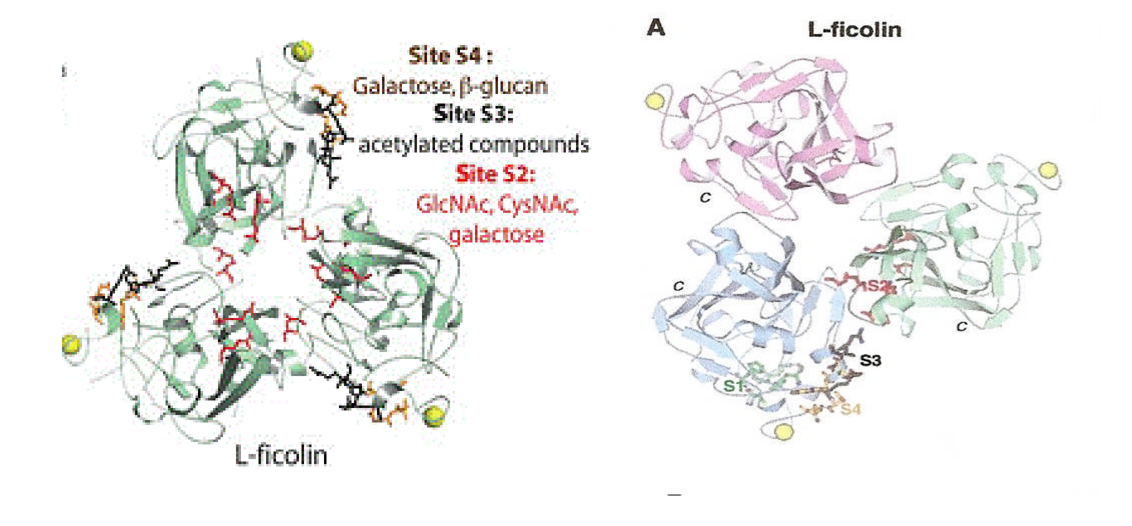
أن الـ DNA أحد الروابط المفترضة للفيكولين 2 على سطح الخلايا الميتة في طورها المتأخر فقط والخلايا المتنخرة ويبدو أن هذا الارتباط مختلف عن GlcNAc كونه معتمد على الكالسيوم (175،176) .

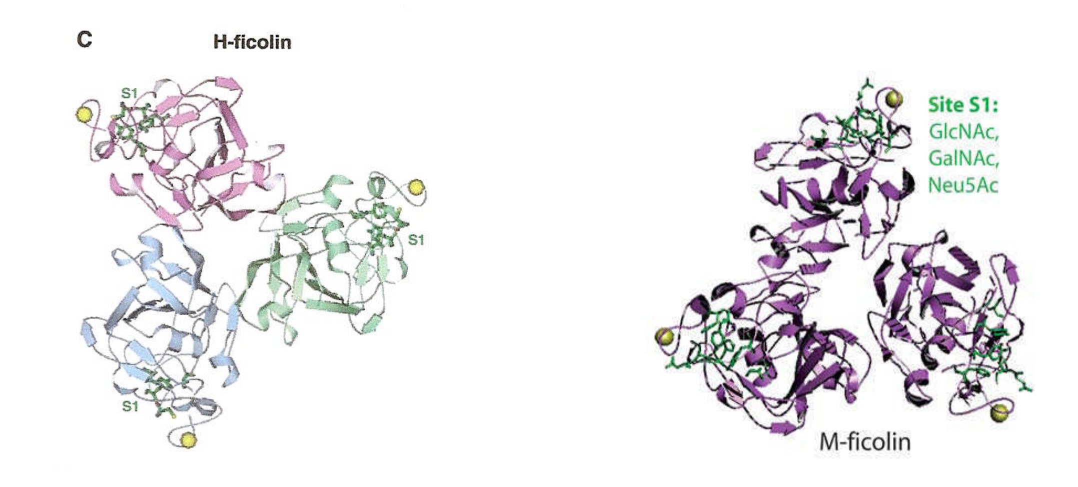
وبناء على ماسبق يستطيع الفيكولين 2 تمييز طيف أكبر من الجزيئات المرافقة للعوامل الممرضة pathogen-associated molecular patterns (PAMP) والتي تقع غالبا في جدر العوامل الممرضة مثل: الليبوتكويك أسيد (LTA) في جدار ايجابيات الغرام، والببتيدوغليكان (PGN)، وعديد السكريد الشحمي lipopolysaccharide (LPS) في جدار سلبيات الغرام، و-1,3-β-D glucan في جدار الخمائر والفطور والـ Elastin والكورتيكوستيروئيدات والـDNA (177،175،131،174).

يبدي الفيكولين 3 ولعا للـD-fucose, GlcNAc, GalNAc ويمكن أن يرتبط بالسالمونيلا التيفية الفأرية والسالمونيلا مينيسوتا (Salmonella Minnesota) وعلى النقيض من الفيكولين 1و2 فإنه لا يرتبط لا مع العنقوديات المذهبة ولا مع العقديات الرئوية، ولكن لوحظ ارتباطه المهم بمحفظة الرويحية المخضرة Aerococcus viridians الغنية بعديدات السكريد (178،138،179).

وكما هو الحال في الفيكولين 2 فإن الفيكولين 3 يرتبط إلى الخلايا الميتة أيضا (175،180). الذي قادنا إلى أن نفترض أن هذه الجزيئات تتدخل في إزالة الخلايا الميتة.

هذا وإن اختلاف نوعية السكاكر التي يرتبط بها الفيكولين والبروتين الرابط للمانوز يعني أن ذراعيهما يكمل بعضهما الآخر، فكل منهما له جمهرة من العوامل الممرضة التي يرتبط بها مختلفة عن الآخر، على الرغم من بعض التداخل أحيانا، فبينما تشير البينة البللورية للفيكولين1و3 بوجود موقع ارتباط واحد على الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين يملك الفيكولين 2 أربعة مواقع مما يدل على مجاله الواسع لارتباطاته أكثر من الفيكولينات الأخرى (150،181).





الشكل (31) مقارنة مواقع الارتباط على الفيكولينات الثلاثة (S1 لون بالأخضر ،S2 بالأحمر، S3 بالأسود، S4 بالبرتقالي)، بينما تظهر ايونات الكالسيوم بشكل كرات ذهبية (150).

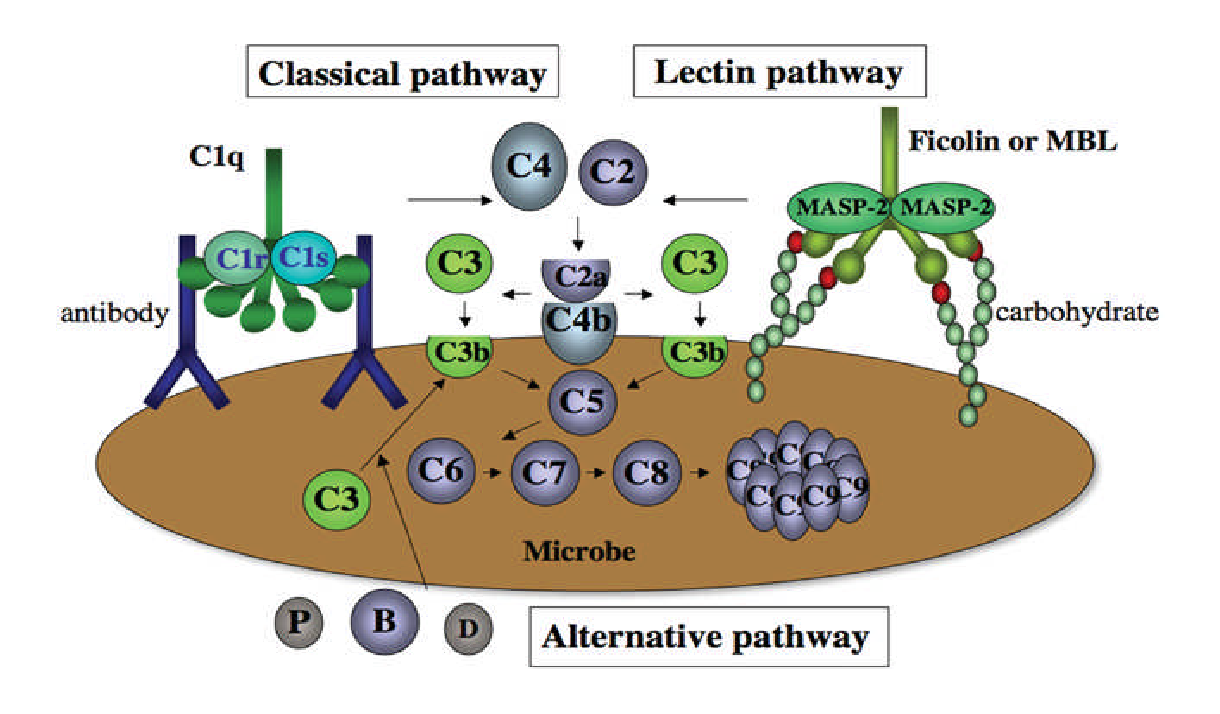
الفيكولين	روابط الكربوهيرات	روابط أخرى
الفيكولين 1	· GlcNAc · GalNAc	· sialic acid
الفيكولين 2	· GlcNAc	· N-acetylneuraminic acid · lipoteichoic acid · C-reactive protein · fibrinogen · fibrin · 1,3-β-D-glycan · DNA · Elastin · corticosteroid · Peptidoglycan
الفيكولين 3	· GlcNAc · GalNAc · Fucose	· lipopolysaccharide · polysaccharide

الجدول (5) أهم ارتباطات الفيكولينات (183،182،153).

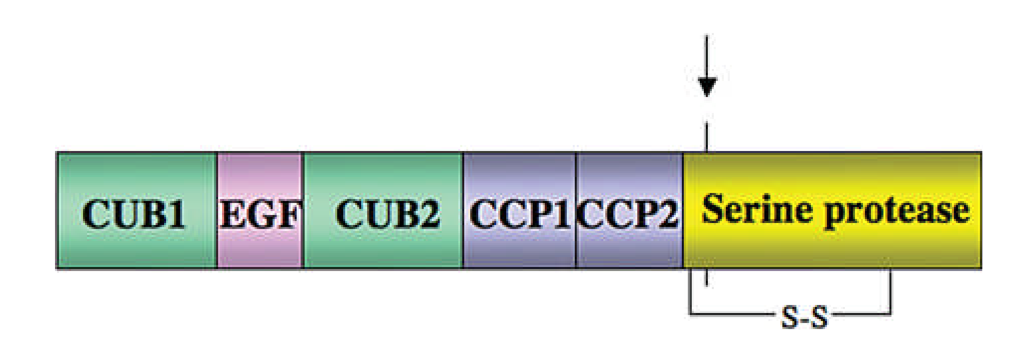
1-3-6- الفيكولين وتفعيل المتممة Ficolin and Complement Activation:

يعد نظام المتممة ذراعا هاما في المناعة الطبيعية، وتتواجد في الدوران بشكل شلال بروتياز مصلية يتم تفعيلها بأساليب متعددة (الشكل 32): أولها السبيل الكلاسيكي الذي يبدأ بتمييز المعقد المناعي من قبل الـ C1q والتفعيل المتتالي للبروتياز المصلية C1r وC1s، بينما يتفعل السبيل الثاني وهو السبيل البديل من قبل العوامل الممرضة نفسها بدون إشراك الأضداد، هذا و يعتبر السبيل الثالث المكتشف مؤخرا إحدى أهم الانجازات الحديثة لأبحاث المتممة ويسمى سبيل اللكتين الرابط للمانوز MBL pathway، والأخير هو بروتين من عائلة الكولكتين الذي يشبه في بنيته الفيكولين ولكن بدل الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين نجد وحدات رابطة (تمييز الكربوهيدرات) (184)، حيث أن البروتين الرابط للمانوز وعبر نهايته الكولاجينية يترافق مع إنزيم البروتياز (MASP) الذي يشبه في بنيته C1rوC1s، فعند ارتباط وحدات التعرف الموجودة على MBL مع الجزيئات المرافقة للعوامل الممرضة (PAMPs) مثل الكربوهيدرات أو مركبات الأسيتيل وغيرها الموجودة على سطح العوامل الممرضة أو الخلايا الميتة فإن الـMASP المرتبطة مع MBL تتفعل فينشطر الارتباط بين arginine-isoleucine (Arg-Ile) وتنقلب من الشكل طليعة الإنزيم عديد الببتيد غير الفعال إلى الشكل الفعال المؤلف من

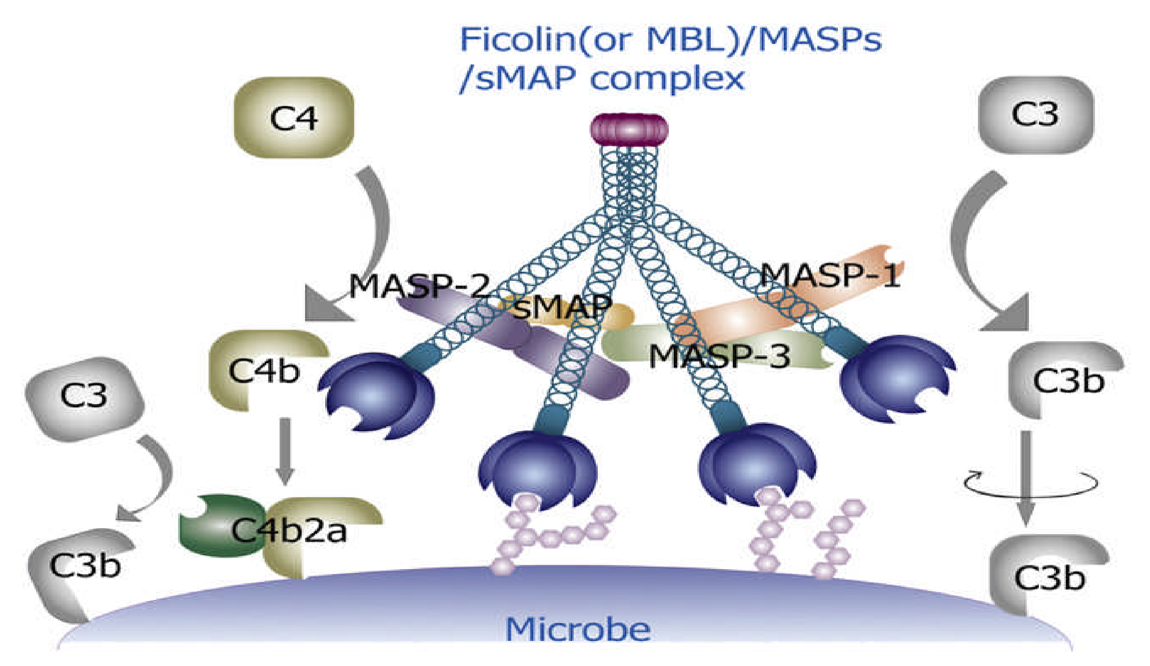
سلسلتين عديدة ببتيد مرتبطة بروابط كبريتية ذات فعالية حالة بروتينية تجاه مكونات المتممة (الشكل 33).



الشكل (32) السبل الثلاثة لتفعيل المتممة (182).



الشكل (33) بنية عائلة MASP ، يشير السهم إلى موضع الانشطار أثناء تحوله من الشكل غير الفعال إلى الشكل الفعال (182).



الشكل (34) رسم تخطيطي لتفعيل المتممة بسبيل اللكتين عن طريق المعقد ficolin/MASPs/sMAP (155).

يوجد عند الانسان 3 أنواع من إنزيمات MASP وهي (MASP-1,MASP-2, MASP-3) (185-187) وشكل مبتور من MASP-2 هو sMAP (188) أو MAp19 (189) (الشكل 34). يشطر الـMASP-1 الـ C3,C2 و يشطر الـ MASP-2 الـ C4,C2 (190)، بينما تبقى وظيفة الـ MASP-3 وsMAP غير معروفة، والنتيجة تشكل الـ C4bوC2a التي ترتبط مع بعضها مشكلة C3 convertase الذي يشطر الـ C3 إلى C3a وC3b، حيث يرتبط الـ C3b بشكل متكافئ ببروتينات سكرية موزعة على سطوح العوامل الممرضة، بالمقابل فإن البالعات والمعتدلات تملك مستقبلات للـ C3b وبإمكانها ربط الخلايا المغلفة بالـ C3b، بعض الـ C3b يرتبط بالمعقد C4bC2a ويشطر C5 إلى C5a وC5b عندها يرتبط الـ C5b بالـ C6, C7, C8 والـ C9 مشكلة معقد مهاجمة الغشاء membrane attack complex (MAC) الذي يعمل على حل خلايا العوامل الممرضة.

إن التشابه في البنية والوظيفة بين الفيكولين والـ MBL يطرح سؤالا إن كان الإنزيمات السابقة ترافق الفيكولين أيضا؟ وبالفعل فقد أثبت التلطيخ والترسيب المناعي أن الفيكولين 2 المعزول من مصل الانسان يرتبط مع (MASP-1, MASP-2, MASP-3, sMAP) (191،131). وأن هذه الإنزيمات تكون بشكل طليعة غير فعالة في المعقد ficolin/MASPs وتنقلب إلى الشكل الفعال خلال تنقية المعقد، كما أن لها فعالية حالة للبروتين تجاه الـ C4،C2،C3 وذلك كما هو الحال في MBL/MASPs، كما أن هذا المعقد لا يتضمن الـ C1r وC1s وبالتالي أضداد الـC1s ليس لها تأثير على تفعيل C4 عبره، مما يشير إلى غياب الـ C1s في المعقد السابق،

وعند ربط أضداد الفيكولين 2 وحيدة النسيلة إلى أطباق مجهرية استطاع المعقد تفعيل الـ C4 مما يدل على قدرته على تفعيل المتممة بالطور الصلب والسائل، وقد تم إثبات القدرة بالطور الصلب بإجراء تجارب ربط فيها معقد الفيكولين السابق إلى سطح سلالات السالمونيلات التيفية TV119 الذي أدى إلى تفعيل C4 (191).

وكما هو الحال بالنسبة للفيكولين 2 فإن كل من الفيكولين 1 والفيكولين 3 يترافق مع MASPs و sMAP ويفعل المتممة بارتباطه ببعض الكربوهيدرات وشطره للـ C2,C4,C3 (191،192،193،168)، ولكن القدرة على تفعيل المتممة تختلف فيما بينها حيث أن قدرة الفيكولين 1 أقل من الفيكولين 3و2 (160).

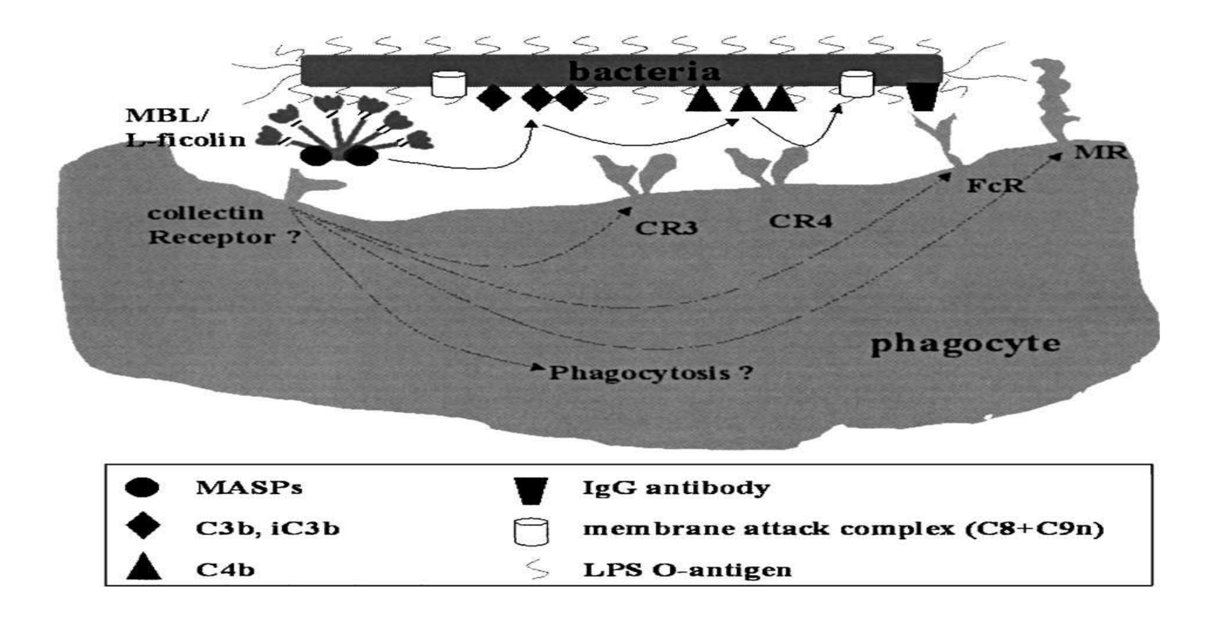
وتجدر الإشارة إلى أن MASP-1 وMASP-3 ينجمان عن نفس الجينة في الموقع 3q27-q28، كما ينجم الإنزيمان MASP-2 وsMAP عن نفس الجينة في الموقع 1p36.3-p36.2.

1-3-7- آليات عمل الفيكولين والمناعة الطبيعية Functional mechanisms of ficolin and innate immunology :

يقود ارتباط الفيكولين بالعامل الممرض إلى إطلاق عمليات مناعية عديدة: كتفعيل المتممة والبلعمة وغيرها وعلى ما يبدو فإن التأثير البيولوجي الأهم هو تفعيل المتممة (153،155) الذي يؤدي للطهي غير المباشر عبر ترسب أجزاء المتممة الطاهية C4b وC3b على العامل الممرض، وهذا يشجع تصفيتها وبلعمتها بواسطة التفاعل مع مستقبلات الـ C4b وC3b على سطح البالعات (161،175)، أو القضاء على الهدف بتشكيل معقد مهاجمة الغشاء بدون تدخل مستقبلات الفيكولين على سطح البالعات (191).

من جهة أخرى يمكن للفيكولينات أن تلعب نفسها دور الطاهي وهذا الفعل مدعوم بقدرة أضداد الفيكولين 1 على تثبيط بلعمة الإشريكية القولونية من قبل الخلايا طليعة الوحيدات U937، وقدرة الفيكولين 2 على تعزيز بلعمة السالمونيلا التيفية من قبل العدلات، كما أن ارتباط الفيكولين 3 بالخلايا الميتة بطورها المتأخر نجم عنه تعزيز الالتصاق والتمثل من قبل البالعات، هذا وإن فعل الطهي هذا يتطلب تفاعل بين هذا البروتين والمستقبلات على سطح البالعات، ومن المرجح أن الفيكولينات تتشاطر مستقبلات الكولكتينات calreticulin(CRT) ومستقبل الميدان الكولاجيني للجزء C1q من المتممة cC1qR (receptor for the collagenous domain of C1q)، والتي أثبت أن الفيكولين 2 و3 ترتبط بها (175،180)، والعديد من المستقبلات الأخرى مرشحة للعب هذا الدور منها CR3,FcR (الشكل 35).

كما أنه عند ارتباط الفيكولين بمستقبلات الكوليكتين فإنه يفعل الخلايا المناعية على إفراز السيتوكينات مثل عامل نخرة الأورام ألفا TNF-α والانترلوكينات IL-1 وIL-8 (177).



الشكل (35) التخلص من العوامل الممرضة بالبلعمة المتواسطة بالفيكولين بشكل مستقل عن المتممة (183).

1-3-8- وظائف أخرى للفيكولينات other functions of ficolins:

يبدو أن الفيكولين 1 يعمل كبروتين طور حاد يخزن بشكل مؤقت في الحبيبات الإفرازية للكريات البيض المعتدلة ووحيدة النوى لذلك يوجد بتركيز قليل في المصل الطبيعي (156)، ولكن يمكن أن يفرز إلى المنطقة المجاورة لإتمام عمله في دفاعات الثوي لدى تحريضه عبر العوامل الممرضة أو السيتوكينيات (158)، ومن المثبت أيضا أن الفيكولين1 يعزز تمثل الجراثيم من قبل الكريات البيض وحيدة النوى، و ذلك بالإضافة لدوره كمستقبل بلعمي بتمييز العوامل الممرضة أيضا lectin-like phagocytic receptor for pathogens (156)، وقد تم إثبات الدور الطاهي للفيكولين 1 أيضا عن طريق بلعمة الخلايا U937 لـ E. coli حيث تم تثبيط فعل البلعمة باستخدام أضداد الفيكولين 1 (156).

كما أنه بالإضافة لارتباط الفيكولين 1 بالـGlcNAc والـ GalNAc فإنه يرتبط مع حمض السياليك Sialic acid الذي يلعب دورا مهما كمستقبل للجزيئات التي تنظم النمو والتمايز الخلوي، وكذلك الاتصال الخلوي الخلوي والالتصاق (194).

وبالملخص باستطاعة الفيكولين 1 أن يتصرف كميدان تمييز مرافق للخلايا cell-associated pattern Recognition مماثل للـ(Toll-like receptors (TLRs وأيضا كمستقبل داخل

الخلايا مثل intracellular nucleotide-binding-oligomerization domain protein (NOD)-like receptors (195).

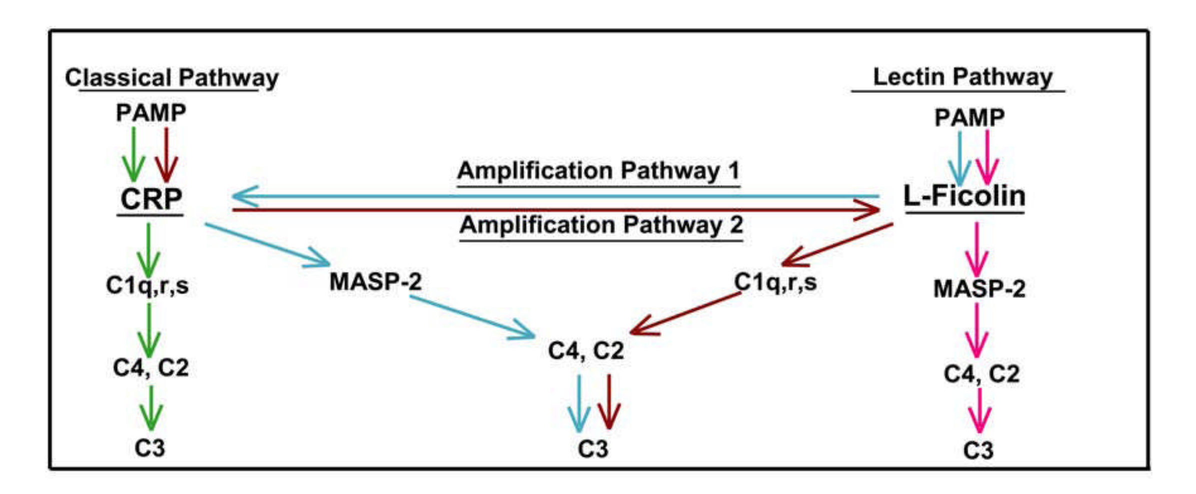
أما الفيكولين 2 بالإضافة لعمله بتفعيل المتممة ودوره كطاهي للبلعمة، هذا الدور الذي تم إثباته عن طريق تعزيز تمثل السالمونيلا التيفية TV119 وبلعمتها من قبل المعتدلات ووحيدات النوى (134)، يتدخل الفيكولين 2 في عملية الاستماتة الخلوية apoptosis بتمييزه الـ DNA، إذ أنه يرتبط إلى الخلايا المتنخرة والخلايا الميتة بطورها المتأخر(175)، وإن طهي الخلايا المتنخرة المحفزة بالفيكولين 2 يعزز التصاقها وتمثلها بواسطة البالعات كما يعزز تفعيل المتممة الذي ينتج عنه الجزء C3b الطاهي أي أنه كما هو الحال في المناعة الطبيعية فإن للفيكولين 2 فعالية طاهية خلال عملية الاستماتة أيضا (175،176)، وفعالية الطهي هذه للفيكولينات البشرية تتوسطها مستقبلات على البالعات كـCR1, cC1q receptor/calreticulin (182)، وهكذا يبدو أن الوظيفة الجديدة للفيكولين 2 هو المساعدة في تمييز وتصفية خلايا المضيف الميتة فيكون بذلك جزيئة كانسة للحفاظ على استتباب الأنسجة.

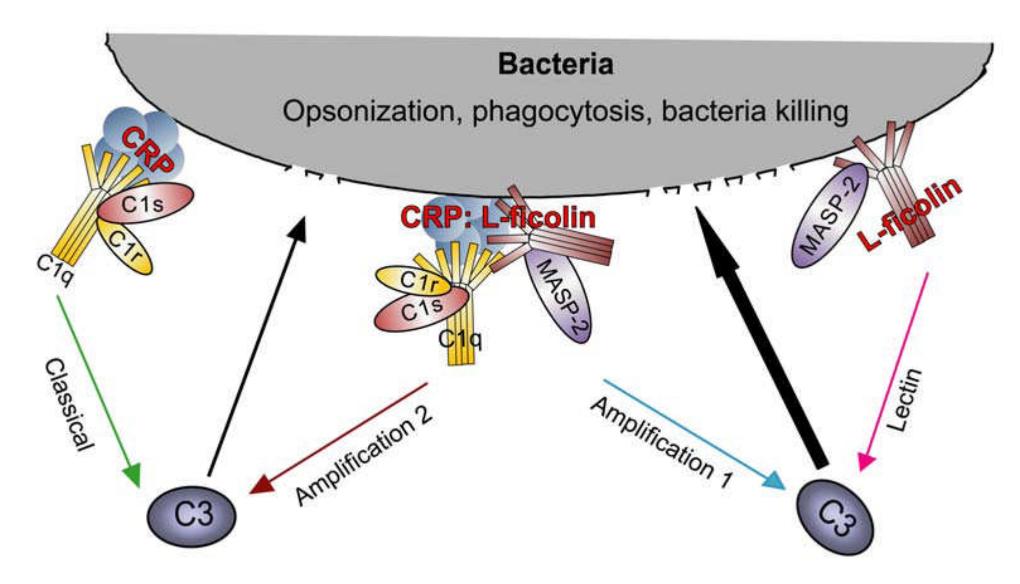
كما يمكن للفيكولين 2 أن يميز البروتين الارتكاسي الالتهابي المترسب CRP (196)، والـ CRP هو بروتين مصلي يرتبط إلى كربوهيدرات خاصة على سطح العوامل الممرضة ،وإن الـ C1 يرتبط إلى CRP عبر الجزء C1q مفعلا المتممة بالسبيل التقليدي من دون تدخل الغلوبولينات المناعية، و قد أثبتت الدراسات أن الفيكولين 2 يرتبط مع البروتين الارتكاسي الالتهابي في الانتانات والالتهابات الموضعية، وهذا الارتباط يقوي ارتباط الـCRP بالعوامل الممرضة، وبالنتيجة يضخم تفعيل المتممة (197)، وهذه الموجودات تقترح التعاون بين الفيكولينات والـCRP خلال الطور الشدة الالتهابي في تهيئة الاستجابة الالتهابية و في المناعة الطبيعية (الشكل 36).

أما الفيكولين 3 فإنه يفعل المتممة كما ذكر سابقا بارتباطه مع MASP وكما هو الحال في الفيكولين 2 فإن الفيكولين 3 يرتبط إلى الخلايا الميتة (175،180)، الذي قادنا إلى أن نفترض أن هذه الجزيئات تتدخل في إزالة الخلايا الميتة.

هكذا فإن للفيكولينات عملا مشابها للـMBL إذ أنها تميز عوامل ممرضة مختلفة عبر وحداتها الرابطة للكربوهيدرات وتحذفها بواسطة الطهي على ما يبدو بواسطة وحداتها الشبيهة بالكولاجين، إذا تعمل الأنواع الثلاثة من الفيكولينات كجزيئات تمييز وتصفية الثوي من العناصر

الغريبة كالعوامل الممرضة والخلايا الميتة عبر سبيل الليكتين (155)، وكل ما سبق يقدم دليل على حقيقة أهمية هذه الجزيئات في المناعة الطبيعية.





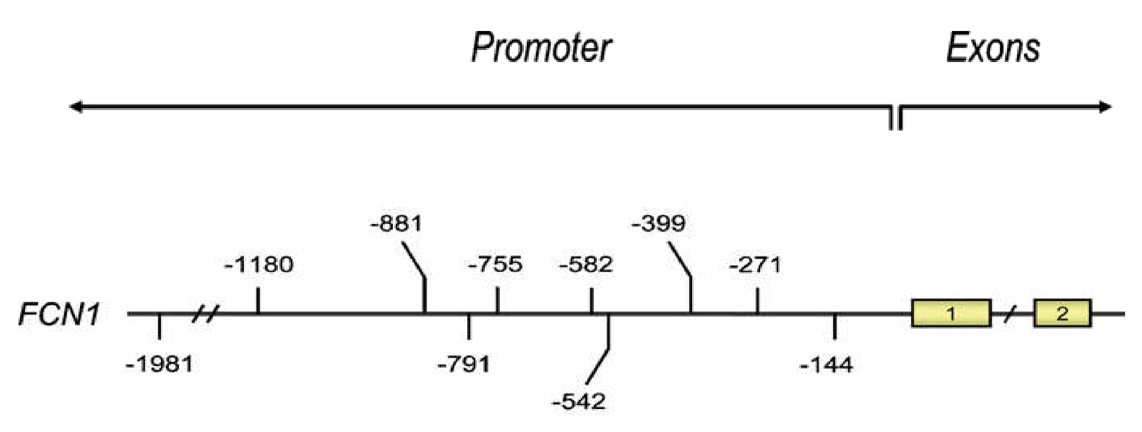
الشكل (36) التعاون بين الفيكولين 2 والـ CRP في تفعيل المتممة (196).

1-3-9- تعدد الأشكال في جينة الفيكولينات والنتائج (المقتضيات) السريرية Genetic polymorphism of ficolins and clinical implication

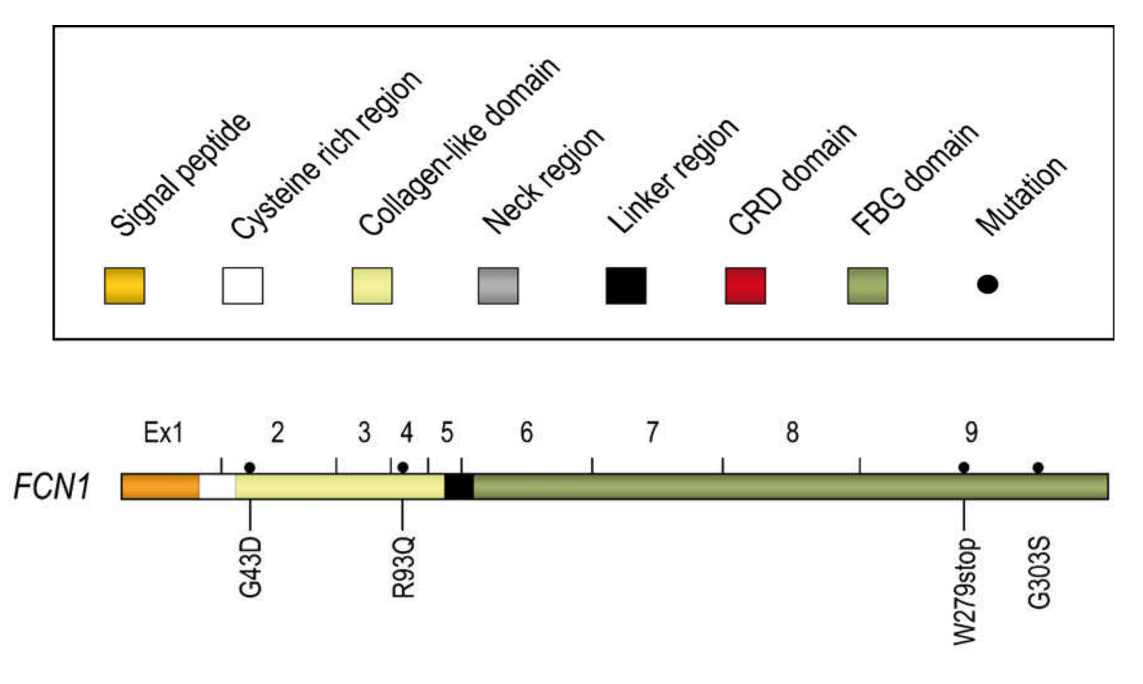
بسبب التشابه بين الفيكولينات و MBL من حيث البنية والوظيفة إلى حد ما، يفترض أن تبدي الفيكولينات دورا مماثلا في علاقتها بالأمراض بطريقة مكملة أو مشابهة لهذا الافتراض، ولكن وعلى نقيض الـ MBL ما تزال الدراسات المتوفرة عن علاقة الفيكولينات مع الأمراض قليلة سوف تذكر لكل فيكولين على حدى.

1-3-9-1- التعدد الشكلي في مورثة الفيكولين 1:

وجدت عدة تغيرات جينية شكلية تقع في منطقة المعزاز(محفز النسخ) Promoter (الشكل 37) وفي الانترونات والاكزونات (الشكل 38)، ومعظم هذه التغيرات تعتمد على العرق على سبيل المثال بعضها موجود عند الأفارقة وغير موجود عند اليابانيين وهكذا (198)، كما أن معظمها لا يؤثر على تسلسل الحموض الأمينية أو على المستوى المصلي للبروتين (152)، وباعتبار الفيكولين 1 يفرز من وحيدات النوى المحيطية وبتركيز قليل فإنه يفضل دراسة تأثير الدور الكامن للآلائل الموجودة في منطقة المعزاز على المستوى المصلي بطرق دقيقة تعتمد على Real time PCR (152)، ومع ذلك كشفت بعض التغيرات التي تؤثر على تركيبة الحموض الأمينية مثل: (Gly43Asp, Arg93Gln, Trp279Stop, Gly303Ser) (198).



الشكل (37) بعض مواقع التعدد الشكلي في منطقة المعزاز من جينة الفيكولين 1 (157).



الشكل (38) أهم الطفرات غير المرادفة في الاكزونات من مورثة الفيكولين1 (157).

قليلة هي الدراسات المتوفرة عن تأثير التعدد الشكلي في مورثة الفيكولين 1 وعلاقته بالأمراض نذكر منها تأثير التعدد الشكلي 1981G>A- في المعزاز (rs2989727) والـ 7918A>G+ في الاكزون التاسع (rs1071583) اللذان ترافقا مع الاستعداد لتطوير التهاب المفاصل الرثياني (199).

على الرغم من أن دور الفيكولينات في إمراضية التهاب الأمعاء والقولون عند الأطفال غير مثبت (لا دور أساسي لها) (200)، مع ذلك ارتبط مستوى الفيكولين 1 المنخفض في الحبل السري مع خطر الموت بسبب التهاب الأمعاء النخري، إذ أن الأطفال الذين توفوا بسبب هذا الداء كان لديهم مستويات منخفضة من الفيكولين 1 بالمقارنة مع الناجين، كما أن الأطفال ذوي المستوى المنخفض من الفيكولين 1 احتاجوا للتهوية الآلية أكثر من الطبيعي وبالتالي ارتفعت خطورة الوفاة من التهاب الأمعاء والقولون النخري عند هؤلاء الأطفال إلى عشرة أضعاف مما يشير للدور الحاسم للفيكولين 1 في الفترة ماحول الولادة (200).

موقع الأساس	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـ SNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني
−1233	A	C	ss76901523	Promoter	–
−1180	G	T	ss76901522	Promoter	–
−881	G	A	ss76901532	Promoter	–

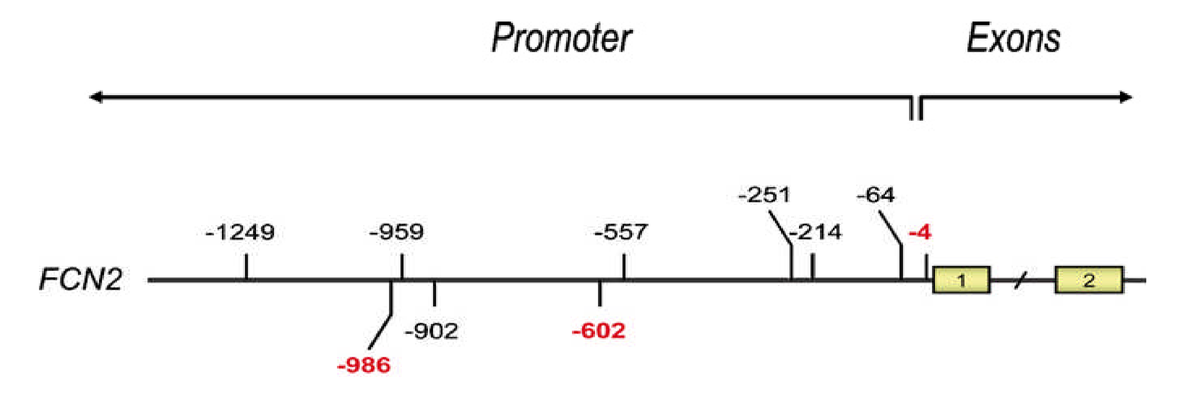
تغير الحمض الأميني	المنطقة	رقم تنصيب الـ SNP	الأليل الأصغر	الأليل الأكبر	موقع الأساس
–	Promoter	ss76901531	A	G	−807
–	Promoter	rs28909068	G	A	−791
–	Promoter	ss76901530	T	C	−756
–	Promoter	ss76901529	A	G	−755
–	Promoter	ss76901528	A	G	−631
–	Promoter	rs17039501	T	C	−582
–	Promoter	rs10120023	A	G	−542
–	Promoter	ss76901527	C	T	−523
–	Promoter	ss76901526	T	C	−472
–	Promoter	rs17039495	A	G	−399
–	Promoter	rs28909976	T	dT	−271
–	Promoter	ss76901525	dG	G	−210
–	Promoter	rs28909977	C	G	−205
–	Promoter	ss76901524	G	C	−160
–	Promoter	rs10117466	A	C	−144
–	Promoter	ss76901533	T	C	−64
Gly11Gly	Exon 1	rs10858293	T	G	+33
–	Intron 1	ss76901534	G	T	+116
–	Intron 1	ss76901536	T	C	+184
Gly43Asp	Exon 2	rs10441778	A	G	+1435
–	Intron 2	ss76901535	A	G	+1538
–	Intron 3	ss76901537	T	C	+3144
–	Intron 3	rs7863062	A	G	+3164
–	Intron 3	rs2989722	C	T	+3231
–	Intron 3	rs7042453	G	A	+3235
–	Intron 3	ss76901538	A	G	+3292
–	Intron 3	rs3012788	G	A	+3374
–	Intron 3	rs2989721	T	C	+3384

موقع الأساس	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـ SNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني
+3387	G	dG	rs11421281	Intron 3	–
+3458	G	A	ss76901539	Exon 4	Arg93Gln
+3512	G	A	ss76901540	Intron 4	–
+4356	C	T	ss76901541	Intron 5	–
+4408	C	A	ss76901542	Intron 5	–
+4410	C	dC	rs 11297508	Intron 5	–
+4473	T	C	ss76901543	Intron 5	–
+4701	G	A	ss76901544	Intron 5	–
+4888	G	C	rs2070622	Intron 6	–
+5358	C	T	rs2274845	Exon 7	Asn190Asn
+5370	C	T	ss76901545	Exon 7	His194His
+7918	G	A	rs1071583	Exon 9	Gln275Gln
+7929	G	A	ss76901546	Exon 9	Trp279Stop
+8000	G	A	ss76901547	Exon 9	Gly303Ser

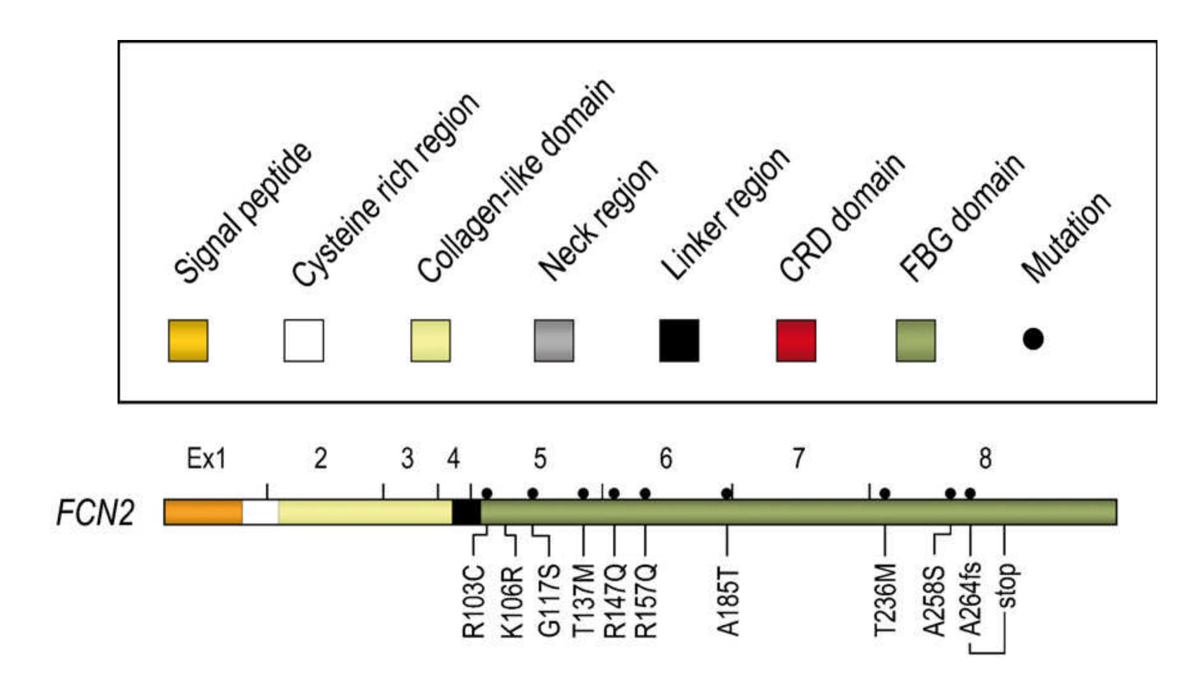
الجدول (6) الـ SNP المكتشفة في مورثة الفيكولين 1 (198).

1-3-9-2- التعدد الشكلي في مورثة الفيكولين 2:

فيما يخص مورثة الفيكولين 2 فقد وجدت تغيرات في المعزاز (الشكل 39) وكذلك في مناطق الاكزونات والانترونات (الشكل 40) منها ما هو صامت في الاكزونات و منها ما يؤدي إلى تغيرات في الحموض الأمينية ومنها ما هو طفرات الحذف أو التبديل (152،201،198)، أهمها (Arg103Cys, His113Tyr, Gly117Ser, Thr137Met, Arg147Gln, Arg157Gln, Ala185Thr, Thr236Met, Ala258Ser, Ala264fs)



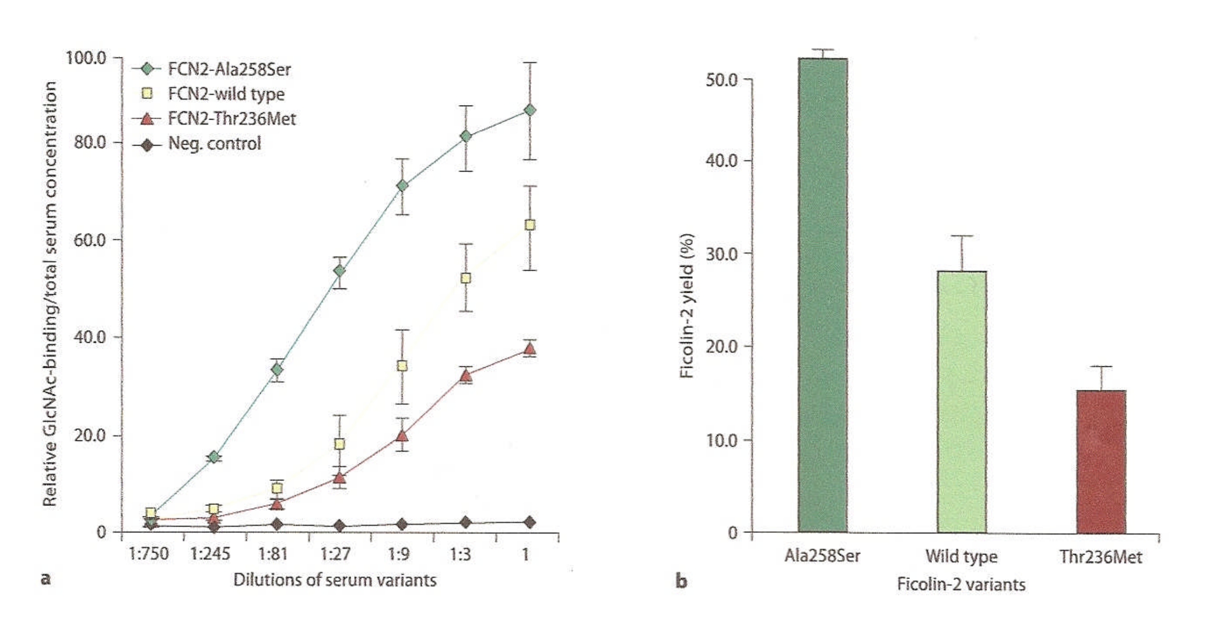
الشكل (39) بعض مواقع التعدد الشكلي في منطقة المعزاز من جينة الفيكولين 2، استخدم اللون الأحمر للدلالة على المواقع التي تؤثر على المستوى المصلي له (157).



الشكل (40) أهم الطفرات غير المرادفة في الاكزونات من مورثة الفيكولين 2.

وتجدر الإشارة إلى أن الـSNP في الموقع (+6359C>T) في الاكزون الثامن للفيكولين 2 والتي أدت إلى تغير الحمض الأميني رقم 236 من ثريونين إلى مثيونين Thr236Met في الوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين ويسمى البروتين FCN2-B أدى إلى انخفاض ملحوظ في القدرة الرابطة للفيكولين الثاني للـ N-أسيتيل غلوكوز أمين المتمركزة على كرات الأغاروز في المتماثلي اللواقح بالمقارنة مع النمط البري، وعلى العكس اختلاف الأليل في +6424G>T والذي يؤدي إلى تغير الحمض الأميني رقم 258 من الآلانين الى سيرين Ala258Ser ويسمى البروتين الناتج FCN2-C وأدى إلى زيادة القدرة الرابطة للفيكولين 2 (الشكل 41)، وإن هذه الآلائل قد تؤثر على استعداد الشخص لأمراض إنتانية أو مناعية ذاتية مختلفة، كما كشف

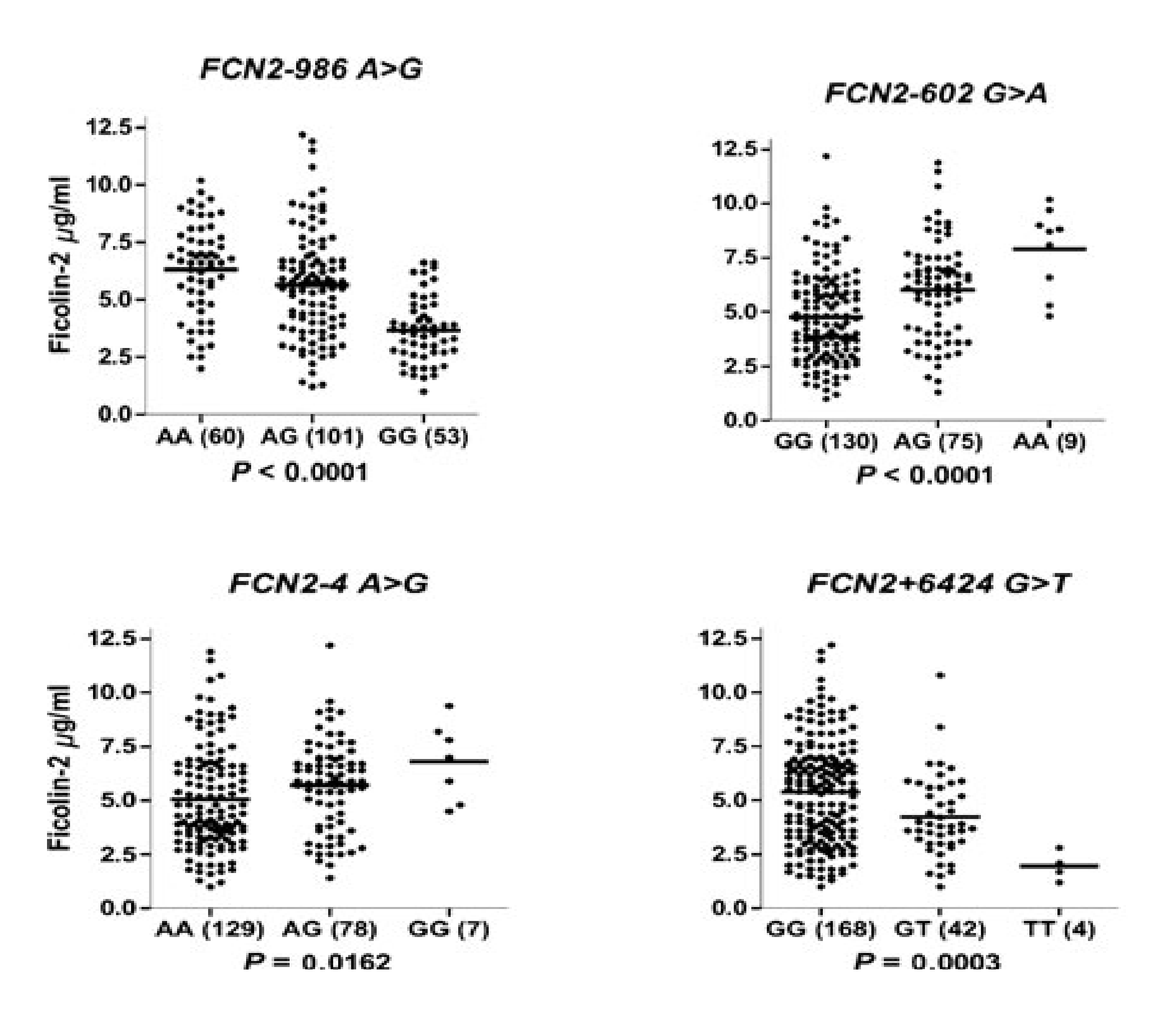
البـروتين FCN2-D والمسؤول عـن تـشكله هـي طفـرة انزيـاح الإطـار frame-shift (Ala264fs) نتج عنها تبدلات في النهايـة C وذلك بـنقص 38 حمض أميـني فـي نـهايـة السلسلة مقارنـة مـع الـنمط الـشائع، وهـذا يفتـرض أن يـؤدي إلـى انخفـاض تركيـز الفيكـولين عـند متمـاثلي اللـواقح بـسبب تـضاعف غيـر صـحيح للجزيئـات (152)، ومـن المبهـر أن التغيـرات الثلاثـة فـي الحمـوض الامينيـة متجمعـة فـي منـاطق متجـاورة مـن الاكـزون الثـامن المرمـز للوحدات الشبيهة بالفيبرونوجين .



الشكل (41) تـأثير التعـدد الـشكلي علـى وظيفـة الفيكـولين 2-اخـتلاف القـدرة الرابطـة تجـاه الــ GlcNAc (202).

هذا وقد اختلف المستوى المصلي لبروتين الفيكولين 2 بين الأشخاص وذلك تحت تأثير مورثي (203،152): فقد أثبتت الدراسات أن التعدد الشكلي في المواقع 4-،602-،986- في المعزاز وكذلك الموقع 6424+ في الاكزون الثامن من المورثة تؤثر على المستوى المصلي للفيكولين 2 على نقيض المواقع 557-، 64-، 6359+ التي لم تؤثر عليه، وكان الشخص المتوافق اللواقح لهذا الموقع يملك التركيز الأعلى أو الأدنى بينما وجد التركيز الوسط عند متخالفي اللواقح (203)، وقد اختلف التركيز المصلي ضعفين تبعا لهذا التعدد الشكلي إذ ترافق التركيز العالي مع الأليل A في الموقع986- (A/A>A/G>G/G)، أيضا ارتبط وجود الأليل A وهو الأليل الأصغر في الموقع 602- مع التركيز العالي أي حسب التسلسل التالي (A/A>A/G>G/G) بينما ترافق الأليل G وهو الأليل الأصغر في الموقع 4- مع التركيز العالي (G/G>G/A>G/G)، أما فيما يتعلق بالموقع 6424+ فالأليل الأكبر G و التسلسل هو (G/G>G/T>T/T) (الشكل 39)، كما لوحظ أن وجود الأليل G في الموقع 986- ارتبط

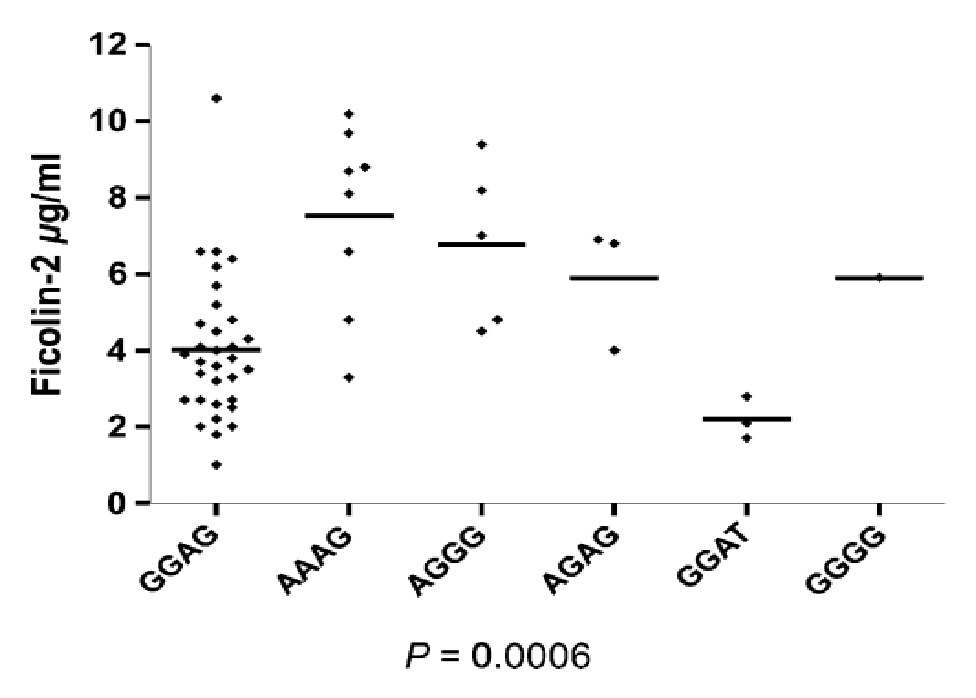
مع الأليل T في الموقع 6424+ والنتيجة انخفاض المستوى المصلي من هنا كانت دراسة النمط الفرداني ضرورية (203،152).



الشكل (42) الارتباط بين النمط الوراثي والمستوى المصلي للفيكولين 2 (تأثير التعدد الشكلي في المواقع (6424+،4-،602-،986-)على المستوى المصلي، يشير الرقم بين قوسين إلى عدد الأفراد الذي وجد عندهم هذا النمط (203).

وقد أثبتت دراسة النمط الفرداني أن وجود الأليل A في 986- يرفع مستوى الفيكولين بكل الأنماط، بينما عند وجود الأليل G في 986- والأليل T في 6424+ في نفس النمط الفرداني فإن التركيز ينخفض (203)، كما ارتبط النمط الفرداني GGAT مع أخفض مستوى للفيكولين بالمصل وذلك على نقيض AAAG الذي ترافق مع أعلى مستوى له، أي اتبع تركيز الفيكولين النمط الفرداني التسلسل التالي:

(AAAG> AGGG> AGAG ≈ GGGG> GGAG> GGAT) كما في (الشكل 40).



الشكل (43) العلاقة بين المستوى المصلي للفيكولين 2 والنمط الفرداني، استخدمت فيها المواقع التالية (−986A>G, −602G>A, −4A>G, +6424G>T) في حساب النمط الفرداني (203).

موقع الأساس	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـ SNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني
−1249	C	A	ss76901556	Promoter	
−1232	T	C	ss76901557	Promoter	
−1012	A	G	ss76901558	Promoter	
−1004	C	A	ss76901559	Promoter	
−986	G	A	rs3124952	Promoter	
−959	G	A	ss76901560	Promoter	
−902	C	A	rs3811143	Promoter	
−602	G	A	rs3124953	Promoter	
−557	A	G	rs3811140	Promoter	
−251	G	A	ss76901561	Promoter	
−214	G	A	rs12344051	Promoter	
−171	C	T	rs3811139	Promoter	
−64	A	C	rs28969369	Promoter	
−4	A	G	rs17514136	Promoter	

تغير الحمض الأميني	المنطقة	رقم تنصيب الـ SNP	الأليل الأصغر	الأليل الأكبر	موقع الأساس
Gly11Gly	Exon 1	ss76901562	T	C	+33
	Intron 1	rs3128627	C	T	+125
Gly54Gly	Exon 2	ss76901563	A	G	+1766
	Intron 2	rs3124955	C	T	+1878
	Intron 2	rs3128624	G	A	+2472
Arg74Arg	Exon 3	rs4520243	C	T	+2488
	Intron 3	rs7037264	A	G	+2545
	Intron 4	ss76901564	T	C	+3980
Arg103Cys	Exon 5	ss76901565	T	C	+4423
Gly117Ser	Exon 5	rs12684476	A	G	+4466
Thr137Met	Exon 5	ss76901566	T	C	+4526
	Intron 5	ss76901568	A	G	+4588
	Intron 5	ss76901569	T	C	+4888
Arg147Gln	Exon 6	ss76901570	A	G	+4957
Arg157Gln	Exon 6	ss76901571	A	G	+4987
His181His	Exon 6	rs34789496	T	C	+5060
Ala185Thr	Exon 6	ss76901572	A	G	+5070
	Intron 6	rs12684723	A	G	+5121
Thr236Met	Exon 8	rs17549193	T	C	+6359
Ala258Ser	Exon 8	rs7851696	T	G	+6424
Asn269Asn	Exon 8	ss76901573	T	C	+6459
Ala264fs	Exon 8	rs28357091	A	CT	+6443_44

الجدول (7) الـSNP المكتشفة في جينة الفيكولين 2 (198).

وهكذا على ما يبدو فإنه يتم تنظيم بروتين الفيكولين 2 على مستوى الترجمة عبر التعدد الشكلي في المعزاز أو في البنى الأساسية (التركيبية) للمورثة كما أن تركيز الفيكولين المحدد وراثيا والتغيرات في صلة الربط أو القدرة الرابطة والنوعية قد ساهمت في المزايا الانتقائية للتفاعل بين العوامل الممرضة والثوي بشكل مماثل لما هو الحال عليه في النظام الوراثي للـ MBL، لذلك

درس هذا البروتين والجينة المسؤولة عنه وعلاقته بالأمراض المختلفة بتفصيل أكثر من الفيكولينات الأخرى.

فقد وجد اختلاف ذو مغزى إحصائي في تواتر الأليلين للموقعين 557-،64- من مورثة الفيكولين 2 بين مرضى بهجت ايجابيي HLA-B51 وسلبييها، وعلى ما يبدو أن هناك ارتباط بين مواقع المعزاز هذه والـ HLA-B51 عند هؤلاء المرضى وهذا يشير إلى أن الفيكولين 2 قد يساهم في المناعة الطبيعية لداء بهجت (204).

إن الارتباط الأقوى والأهم فيما يتعلق بالأخماج التنفسية عند الأطفال هو عند مجموعة الأمراض الأليرجيائية التأتبية فقد أثبت أن عوز الفيكولين 2 زاد عند الأطفال ذوي الانتانات التنفسية المتكررة التي تترافق أو تتزامن مع اضطرابات تأتبية، هكذا فإن الفيكولين 2 يلعب دورا مهما في الحماية من العوامل الممرضة ذات المضاعفات الاليرجيائية (205)، وهذا يتوافق مع التراكيز القليلة من الفيكولين 2 عند الأطفال الذين لديهم انتانات تنفسية متكررة حتى بدون اضطرابات تأتبية بالمقارنة مع الشواهد (163).

بينما لم يرتبط التعدد الشكلي للفيكولين 2 مع مرض المكورات الرئوية الغازية على عكس MBL ولكن مع ذلك لا يمكن استثناء التأثيرات القليلة للاختلافات الجينية له بالاستعداد لهذا المرض، مما يقترح أن له دور ولكن غير حاسم في المناعة الطبيعية تجاه الإصابة بالمكورات الرئوية (206).

تبين إحدى الدراسات انخفاض تركيز الفيكولين 2 بشدة عند عدد قليل من مريضات الإسقاطات المتكررة (162)، وفي دراسة أخرى انخفض أيضا بشكل واضح عند مرضى أمراض الدم اللذين تلقوا علاج كيماوي على نقيض الـMBL ولكن بدون دليل (علاقة مثبتة) بالاستعداد للإنتانات (أيضا على خلاف) MBL عند هؤلاء المرضى (207).

أيضا لوحظت زيادة معدل ولادة الأطفال ناقصي وزن الولادة بمقدار 4 أضعاف عند الحوامل اللواتي لديهن تركيز الفيكولين 2 منخفض بالمقارنة مع الطبيعيات، بينما انخفضت نسبة الوزن المنخفض بين حديثي الولادة ذوي المستوى العالي للفيكولين 2 بالمقارنة مع هؤلاء بتراكيز منخفضة منه، وهذا يثبت وجود ارتباط قوي بين عوز الفيكولين 2 والخداج وانخفاض وزن الولادة والإنتانات ماحول الولادة (208).

وفي اتجاه مشابه وجد WANG انخفاض المستوى المصلي للفيكولين 2 وزيادة التعبير عنه في المشيمة عند مريضات ما قبل الإرجاج بمقارنتهن مع الحوامل الطبيعيات (209).

و في دراسة عن علاقة الساركوئيد مع الفيكولين 2 لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي بين تركيز الفيكولين 2 والـ MBL بين مجموعة المرضى والشاهد (210).

لم يكتف البعض بدراسة تواتر الأليل وتأثيره على الاستعداد للمرض وإنما شاركه بدراسة النمط الفرداني فعلى سبيل المثال لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي بتوزع الآلائل في المواقع 6424+/-4/-602/-986- بين مرضى الجذام والشواهد على خلاف الأنماط الفردانية: حيث انخفض النمط الفرداني AGAG للمواقع6424+/-4/-602/-986- على التوالي عند مرضى الجذام بالمقارنة مع الشواهد ومن المعروف أن هذا النمط يترافق مع المستوى الطبيعي من الفيكولين 2 في الدم، وهذا يشير للدور الواقي للفيكولين 2 تجاه الاستعداد للإصابة بالجذام وأنه قد يكون عامل إضافي يساهم في القضاء على متفطرات الجذام عن طريق بلعمتها من قبل وحيدات النوى (211).

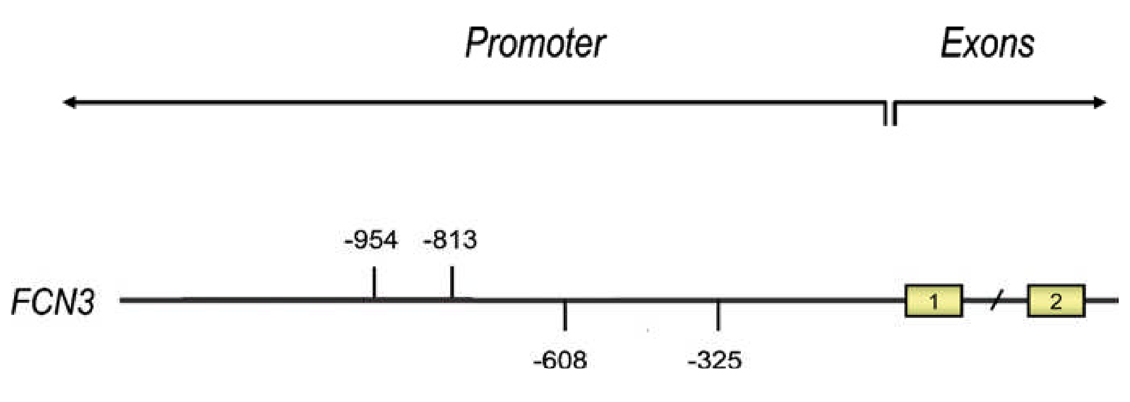
كما أن النمط الفرداني G/G/A للمواقع 4-/602-/986- الذي يترافق مع المستوى المنخفض للفيكولين 2 كان قد ارتفع عند المرضى المصابين بأمراض القلب الروماتويدية المزمنة chronic rheumatoid heart disease (CRHD) بالمقارنة مع الأصحاء وهذا يقترح أن هذا النمط الفرداني يلعب دورا بتطور حمى الروماتزم Rheumatic fever (RF) إلى شكل مزمن، وعلى النقيض فإن النمط A/G/A للمواقع 4-/602-/986- له دور واق ضد الإصابة بحمى الروماتزم وضد تطور حمى الروماتزم (الرثوية) وأمراض القلب الروماتويدية المزمنة، أما النمط A/G/G لنفس المواقع ترافق مع الحماية من CRHD بالمقارنة مع الحمى الرثوية وبناء عليه اقترحت الدراسة أن النمط الفرداني للمواقع الثلاث السابقة يؤثر على الاستعداد للإصابة بالـRF وشكلها المزمن CRHD، وأن النمط الفرداني G/G/A لمواقع المعزاز الثلاثة 4-/602-/986- يمثل عامل خطورة بينما يشكل A/G/G و A/G/A عامل حماية ضد تطور الـ CRHD هذا الاضطراب الذي ماتزال إمراضيته غير مفهومة بشكل جيد (212)، وهذا ما يقود للقول أن المستوى المنخفض من الفيكولين 2 الناجم عن طفرة على مستوى الترجمة يمكن أن يعرض الشخص لإنتان متكرر أو أكثر شدة بالعقديات.

1-3-3-9-3- التعدد الشكلي في مورثة الفيكولين 3:

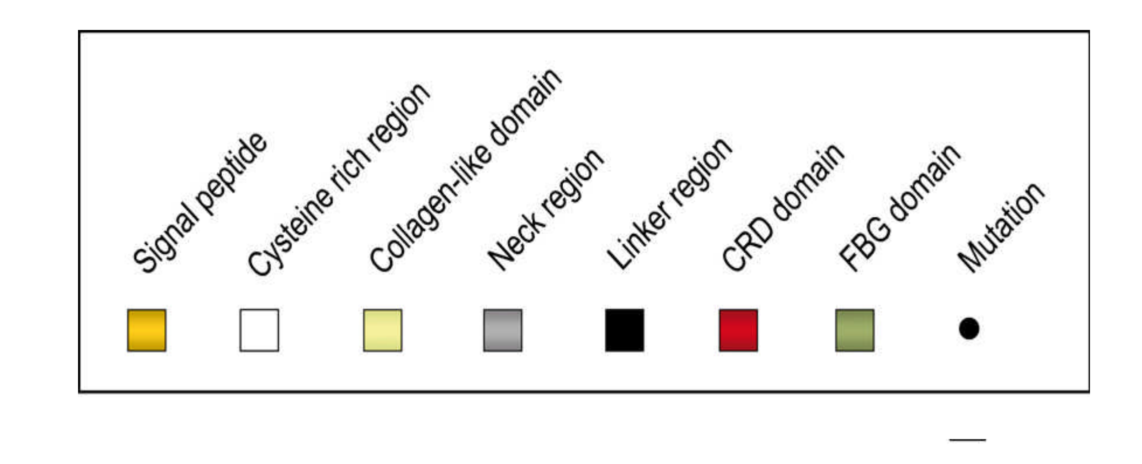
وجدت العديد من مناطق التعدد الشكلي في DNA المعزاز والاكزونات للفيكولين 3 (الشكل 44،45)، ولكن ليس لها تأيثر على مستواه المصلي (152،198)، مع أن بعضها أدى لتغيرات الحموض الأمينية مثل:

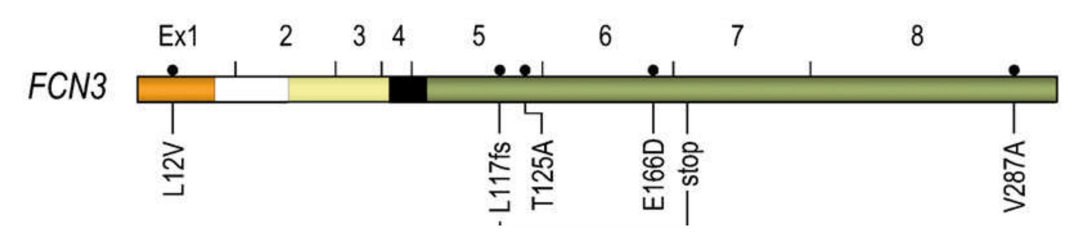
(Leu12Val, Leu117fs, Thr125Ala, Glu166Asp, Val287Ala)

لكن كان تواترها منخفضا وأهمها الطفرة Leu117fs (rs28357092) في الموقع 1637+ من الاكزون الخامس في جينة الفيكولين 3 والذي يرمز لمنطقة الرقبة حيث أن هذه الطفرة تؤدي إلى توقف مبكر للكودون في الاكزون الخامس و التي تؤثر على تركيبة الحموض الأمينية في النهاية C ابتداء من الحمض 117 إلى 180 والبروتين عديم المعنى الناتج يتوقف بسبب كودون التوقف المبكر وبالتالي هذه الطفرة تؤدي الى فيكولين 3 مبتور (Leu117fs) ينقصه 183 حمضا أمينيا أي تقريبا النهاية الفيبروجينية كلها (الشكل 46)، ولكن الدراسات على الفيكولين المأشوب أظهرت أنه لا يمكن أن يعبر عن هذا الفيكولين المبتور (166)، وبذلك ينقص المستوى المصلي عند متغايري اللواقح بينما عند متماثلي اللواقح تحدث متلازمة عوز متممة مناعي جديدة (166)، وبالفعل هذا ما أثبت لاحقا حيث انخفض المستوى المصلي عند متخالفي اللواقح إلى النصف بالمقارنة مع النمط البري مما يدل على أن إنتاج البروتين كان من الأليل البري وليس من الطافر (213)، بينما انعدم تركيز الفيكولين 3 عند مريض متماثل الزيجوت وأدى ذلك إلى نقص في المتممة المترسبة على البنى المحتوية على أستيل، وعانى المريض بسبب ذلك من انتانات تنفسية خطيرة نجم عنها أذية رئوية وخراجات دماغية وهذا يتوافق مع التعبير العالي للفيكولين الثالث في الرئة والخلايا الدبقية في الدماغ كما ذكر سابقا (160،164)، مما يدل على أن الطفرة FCN3+1637delC هي المسؤولة عن ذلك (213).

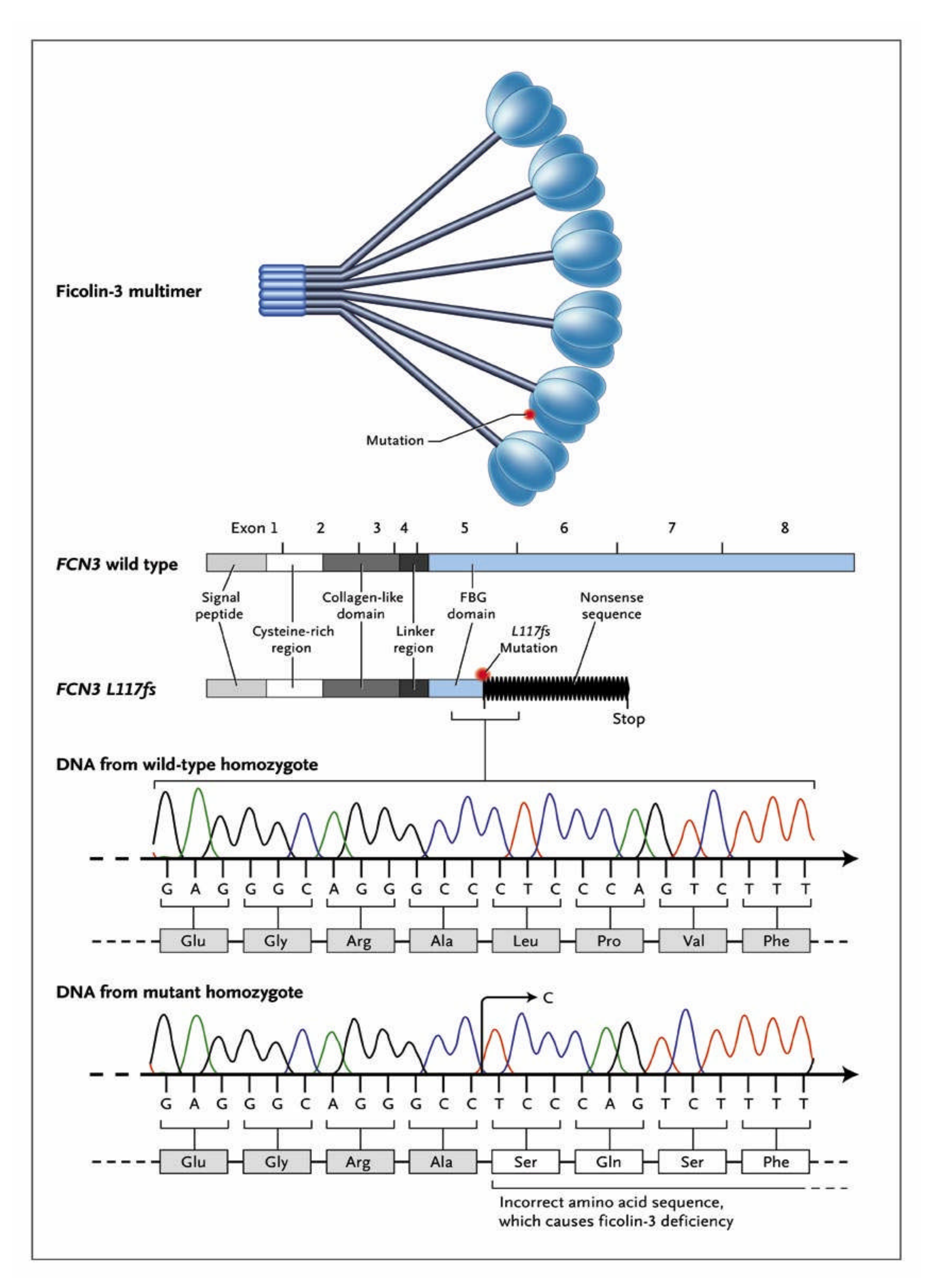


الشكل (44) بعض مواقع التعدد الشكلي في منطقة المعزاز من جينة الفيكولين 3 (157).





الشكل (45) أهم الطفرات غير المرادفة في الاكزونات من جينة الفيكولين3 (157).



الشكل (46) بنية الفيكولين 3 (الشكل السداسي) وتأثير الطفرة (L117fs)_+1637delC .
في الجزء السفلي تسلسل الأسس لجزء من الاكزون الخامس وتأثير الطفرة على الحموض الأمينية (213).

موقع الأساس	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـ SNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني
−954	C	T	rs41465749	Promoter	
−813	G	A	ss76901548	Promoter	
−608	G	A	rs28385648	Promoter	

موقع الأساس	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـ SNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني
−325	G	A	rs41415450	Promoter	
+34	C	G	rs41366544	Exon 1	Leu12Val
+51	G	A	ss76901549	Exon 1	Gly17Gly
+1402	T	C	ss76901549	Intron 4	
+1549	T	C	rs28385723	Intron 4	
+1637	C	dC	rs28357092	Exon 5	Leu117fs
+1663	A	G	ss76901551	Exon 5	Thr125Ala
+3836G	C	G	rs3813800	Intron 5	
+3836dC	C	dC	ss76901552	Intron 5	
+3836A	C	A	ss76901553	Intron 5	
+3951	G	C	ss76901554	Exon 6	Glu166Asp
+5543	T	C	ss76901555	Exon 8	Val287Ala

الجدول (8) الـSNP المكتشفة في جينة الفيكولين 3 (198).

فيما يتعلق بعلاقة الفيكولين 3 مع الأمراض فقد ارتبط تركيزه عكسيا مع شدة التشمع الكبدي (انخفض تركيزه مع زيادة درجة التشمع) وارتفع في التهاب الكبد الحاد (214)، كما أنه قد ارتفع عند مرضى الذئبة الحمامية الجهازية هذا وقد ترافق ارتفاع المستوى المصلي للفيكولين 3 عند مرضى الذئبة مع بعض التظاهرات الخاصة كانحلال الدم وايجابية اختبار كومبس وقلة اللمفاويات هكذا فإن الارتباط الايجابي مع فعالية المرض في الذئبة الحمامية الجهازية قد يشير للدور الإمراضي الفيكولين 3 في هذا المرض (215).

من جهة أخرى انخفض تركيز الفيكولين 3 عند مرضى الساركوئيد وهذا يقترح ارتباط ممكن للفيكولين 3 في الفيزلوجية المرضية لهذا المرض وذلك على عكس الفيكولين 2 (210).

بدراسة أخرى لم يرتبط التعدد الشكلي في جينة الفيكولين 3 مع زيادة خطورة انتانات السبيل التنفسي خلال السنوات الأربعة الأولى من العمر حيث أنه لم يكن هناك فرق هام إحصائيا في تواتر النمط الجيني والنمط الفرداني للفيكولين 3 بين المرضى والشواهد (216).

بينما تشير دراسة أخرى إلى أن عوز الفيكولين 3 عند الأطفال المصابين بأورام والمعالجين كيميائيا زاد من احتمال إصابتهم بالحمى وقلة العدلات إلى ضعفين، مما أطال مدة المعالجة الملطفة بالمشفى وكذلك المعالجة بالصادات، كما أن زيادة احتمال الإصابة بالحمى ونقص

العدلات عند المرضى ذوي مستوى الفيكولين 3 المنخفض أيضا زاد من احتمال تجرثم الدم بمقدار 3 أضعاف وهذا يقترح أن يكون للفيكولين 3 دور مهم في الدفاع الغريزي ضد الانتانات بالجراثيم الغازية عند ضعفي المناعة، وأنه يمكن اعتبار عوز الفيكولين 3 عامل خطورة لحدوث تجرثم الدم والحمى وقلة العدلات عند هؤلاء المرضى (217).

وأخيرا في دراسة علاقة المستوى المصلي للفيكولين 3 مع داء كرون لم يكن هناك فرق هام إحصائيا في تركيز الفيكولين 3 بين المرضى والشواهد (218) .

Base position	Region	Amino acid change	PFH
FCN1 + 1435	Exon 2	Gly43Asp	Gly-Gly-Ala
FCN1 + 3458	Exon 4	Arg93Gln	Arg/–/–
FCN1 + 7929	Exon 9	Trp279Stop	Conserved
FCN1 + 8000	Exon 9	Gly303Ser	Conserved
FCN2 + 4423	Exon 5	Arg103Cys	Conserved
FCN2 + 4453	Exon 5	His113Tyr	Tyr/His/Ala
FCN2 + 4466	Exon 5	Gly117Ser	Conserved
FCN2 + 4526	Exon 5	Thr137Met	Conserved
FCN2 + 4957	Exon 6	Arg147Gln	Conserved
FCN2 + 4987	Exon 6	Arg157Gln	Conserved
FCN2 + 5070	Exon 6	Ala185Thr	Ala/Ala/Leu
FCN2 + 6359	Exon 8	Thr236Met	Thr/Thr/Ser
FCN2 + 6424	Exon 8	Ala258Ser	Conserved
FCN2 + 6443_44	Exon 8	Ala264fs	Conserved
FCN3 + 34	Exon 1	Leu12Val	Conserved
FCN3 + 1637	Exon 5	Leu117fs	Thr/Thr/Leu
FCN3 + 1663	Exon 5	Thr125Ala	Conserved
FCN3 + 3951	Exon 6	Glu166Asp	Asp/Asp/Glu
FCN3 + 5543	Exon 8	Val287Ala	Tyr/Tyr/Val

الجدول (9) يشير إلى أهم الطفرات غير المرادفة في جينة الفيكولينات، يشير الـ(PFH) إلى تشابه عائلة البروتينات (تشابه الحموض الأمينية الطافرة بين الفيكولين1،الفيكولين 2،الفيكولين 2) (198).

2- الدراسة العملية:

2-1- هدف البحث Aim of the study :

يرمي البحث إلى دراسة دور جينة الفيكولين 2 في الاستجابة المناعية الطبيعية لدى التعرض للإصابة بالليشمانية الجلدية، وكشف النقاب عن طبيعة علاقة هذا الجين بالاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية .

2-2- أهمية البحث Importance of the study:

تعتبر الليشمانية مرضا مستوطنا في سوريا وعلى الرغم من الجهود الكبيرة المبذولة للسيطرة على المرض مايزال الوقوع السنوي عاليا، وبالإضافة للارتباط القوي بين الأنواع الطفيلية المسببة والصورة السريرية للمرض فقد وجدت اختلافات سريرية كبيرة تعود للكفاءة المناعية للمضيف (219،38،220) وخاصة ما يخص المناعة الطبيعية التي يبدو أنها تؤثر على الاستعداد للإصابة والتطور السريري للآفة إلى حد بعيد (23،13،222،221)، لكن وعلى الرغم من ذلك مازالت الدراسات المجراة على دور العوامل الوراثية التي تراقب الجواب المناعي الطبيعي في الاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية في سوريا محدودة.

لذلك رأينا أنه من الأهمية بمكان دراسة علاقة ممكنة بين الأشكال السريرية المختلفة وإحدى الوظائف الجينية التي تتدخل في مراقبة المناعة الطبيعية وهو الفيكولين 2 الذي يمثل أحد العوامل الهامة التي تتوسط تعرف الجهاز المناعي على العوامل الممرضة حيث يرتبط بالجزيئات المرافقة لها (PAMPs) مما يقود إلى البلعمة وتفعيل المتممة عبر سبيل اللكتين، هذا وإن طيف العوامل الممرضة التي يميزها الفيكولين 2 واسعة ومن المثبت أيضا أن المستوى المصلي لهذا البروتين مرتبط بالتعدد الشكلي للمورثة لبعض المواقع في منطقة المعزاز (4-,602-,986-) والموقع (6424+) في الاكزون الثامن، وبما أنه توجد معطيات تدل على وجود علاقة بين التعدد الشكلي لجينة الفيكولين 2 والاستعداد للإصابة بالعديد من الأمراض الخمجية كالانتانات التنفسية المتكررة و الإصابة بالمتفطرة الجذامية، فقد وجدنا أنه يجدر بنا أن نطرح التساؤل حول إمكانية وجود علاقة بين التعدد الشكلي للفيكولين 2 و الاستعداد والتطور السريري لليشمانية الجلدية.

2-3- مكان وزمان الدراسة Place and date of the study:

أجريت الدراسة على مرحلتين وفي مكانين: إذ أجريت المرحلة الأولى في سوريا حيث تم جمع العينات وعزل الـ DNA البشري في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية بكلية الطب البشري ، بينما أجريت المرحلة الثانية في قسم الطفيليات البشرية -معهد الطب المداري-جامعة توبنجن-

ألمانيا بإشراف البروفسور Juergen Kun أستاذ الطفيليات البشرية وذلك كمنحة مقدمة من هيئة الـ DAAD لمدة 6 أشهر من 1-9-2008 لغاية 28-2-2009 .

2-4- مواد وطرائق البحث Methods and materials:

2-4-1- مجموعة الدراسة (المرضى والشواهد):

تمت الدراسة على مجموعتين بشريتين هما مجموعة المرضى ومجموعة الأصحاء:

2-4-1-1- مجموعة المرضى: وتضمنت 235 مريضا يبدون أشكالا مختلفة من الليشمانية الجلدية توزعوا على الشكل التالي: 87 (37%) إناث و148 (63%) ذكور وكان وسطي أعمارهم 26 عاما مع انحراف معياري قدره 15، تم اختيارهم من مرضى العيادات الخارجية في مشفى الأمراض الجلدية والزهرية الجامعي في دمشق ومن مراكز ليشمانية في دمشق وخارجها وذلك بناء على إثبات إصابتهم بالليشمانية الجلدية من خلال الفحص السريري ورؤية الطفيلي في اللطاخات الجلدية الملونة بتلوين غيمزا، تم استجواب كل مريض وملء استمارة البحث .

2-4-1-2- مجموعة الأصحاء: وتضمنت 232 فردا توزعوا كما يلي: 87(38%) إناث و145(62%) ذكور كان وسطي أعمارهم 26 عاما مع انحراف المعياري قدره 13 تم اختيارهم ممن ليس لديهم أية إصابة سابقة أو حالية بالليشمانية الجلدية حيث تم استجوابهم للتأكد من عدم تعرضهم لإصابة حالية أو سابقة بالليشمانية اعتبروا كشواهد أصحاء، ينتمي المرضى والشواهد إلى نفس السوية الاجتماعية والاقتصادية وكذلك المناطق الجغرافية .

2-4-1-3- العينات: تم سحب 2 مل من الدم الوريدي من المشاركين بالدراسة على أنبوب يحوي مانع تخثر EDTA وذلك بعد الحصول على موافقتهم.

2-4-1-4- استمارة البحث: وتضمنت المعلومات التالية:

هوية المريض:

الاسم.............. العمر............الجنس.........................

المهنة..................العنوان الحالي.....................................

عدد سكان المنزل ....

الفحص السريري:

عدد الآفات ....مكان الاندفاعات ....

عمر كل اندفاع............

أشكال الاندفاعات: نقطي نزفي........... حطاطي..........متعرج.........

متعرج مغطى..........تؤلولي...........متندب..........

الأعراض المرافقة: ألم.................حكة ....وذمة.............

ضخامة عقد لمفاوية ....أعراض أخرى...............

التشخيص السريري:.................................**التشخيص المخبري:**..............

الوضع الوبائي: الأماكن التي زارها المريض في الستة أشهر الأخيرة ....

وجود إصابات متماثلة: في الأسرة...............في العمل..............في محيط المنزل..........

وجود حيوانات في مكان تواجد الإصابة: قوارض..........كلاب أو قطط...........حشرات........

العلاج: نوعه ....

الطريقة التبعة في العلاج: مكان التطبيق...................

الجرعات.......................الفترة الزمنية..................

نتائج المتابعة بعد العلاج: شفاء............................تحسن ....

نكس...........................إزمان............

2-4-2- الطرائق المستخدمة:

2-4-2-1- عزل (استخلاص) الحمض الريبي النووي المنقوص الأوكسجين الـ DNA (DNA extraction): وقد أجريت هذه المرحلة في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية-كلية الطب-جامعة دمشق.واستخدم لهذا الغرض كيت (QIAamp™ DNA extraction kit) من شركة (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

الأدوات والكواشف اللازمة:

- إيثانول (96-100%).
- أنابيب 1.5 مل وأخرى 2 مل.
- رؤوس ميكروبيبيت مزودة بحاجز.
- دوارة Vortexer.
- محم مائي أو جاف بحرارة 56°.
- قفازات مناسبة.

2-4-2-1-1- تحضير المحاليل وتخزينها كما يلي:

- تحل بودرة البروتياز بـ5.5 مل من محلول البروتياز، ويكون المحلول الناتج ثابت لمدة شهرين عند تخزينه بالحرارة من 2°-8° وينصح بتخزينه بالحرارة -20° لإطالة عمر البروتياز مع تجنب تكرار الفك والتجميد.
- يخزن الوقاء AL وحجمه 54 مل بحرارة الغرفة 15°-25° وهو ثابت بالشروط السابقة لمدة 1 سنة.

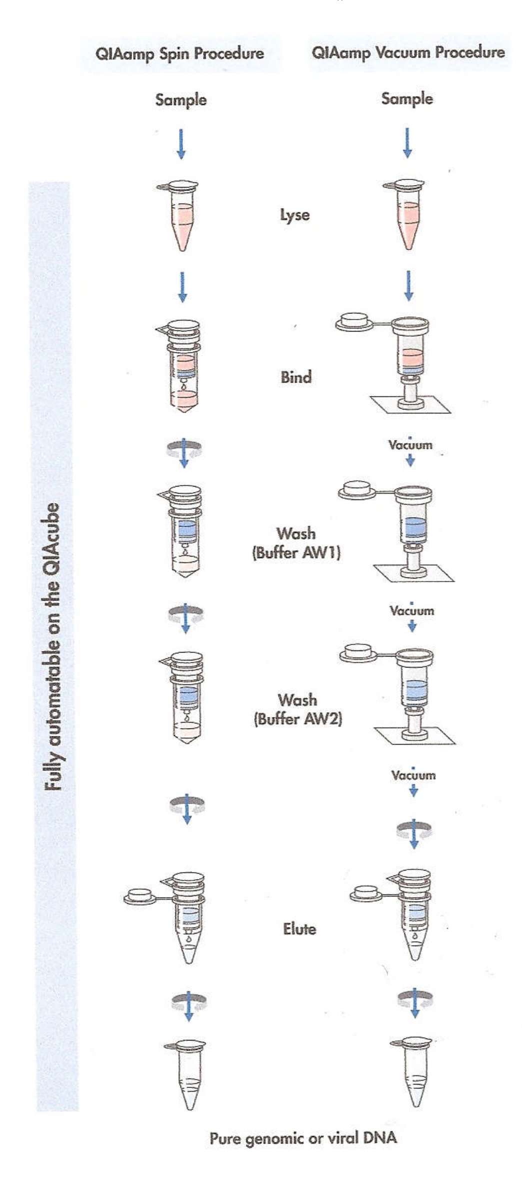
- يمدد الوقاءAW1 الموجود بشكل ركازة بحجم 95 مل بالحجم المناسب من الإيثانول والمحلول الناتج ثابت لمدة سنة بالحرارة 15^o-25^o.
- يمدد الوقاء AW2 الموجود بشكل ركازة بحجم 95 مل بالحجم المناسب من الإيثانول والمحلول الناتج ثابت لمدة سنة بالحرارة 15^o-25^o.

2-4-2-1-2- طريقة العزل: وهي كالتالي:

- يوضع 20 ميكرولتر من البروتياز في قعر أنبوب (1.5 مل).
- يضاف 200 ميكرولتر من عينة الدم المسحوبة على مانع تخثر EDTA.
- يضاف 200 ميكرولتر من الوقاء AL إلى العينة ويمزج المحتوى لمدة 15 ثانية للحصول على محلول متجانس.
- يحضن المزيج بحرارة 56^o لمدة 10 دقائق إذ يصل DNA yield ذروته بعد الانحلال بـ 10 دقائق، بينما لا تؤثر مدة الحضن الأطول على كمية الـ DNA.
- يثفل (ينبذ) الأنبوب السابق لإزالة القطرات العالقة على جدار الأنبوب الداخلي وحواف الغطاء الداخلية.
- يضاف 200 ميكرولتر من الإيثانول 96-100 %إلى العينة وتمزج لمدة 15 ثانية ثم ينبذ الأنبوب أيضا.
- ينقل المزيج السابق من المرحلة السابقة إلى column موضوع فوق أنبوب جمع 2 مل وذلك بدون ترطيب حواف الـcolumn، بعدها تغلق الطبقة وينبذ العمود (8000 rpm) =(g ×6000) لمدة دقيقة ، يرمى الأنبوب الذي يحوي الرشاحة ويوضع العمود في أنبوب جديد سعته 2 مل، يجب الانتباه إلى إغلاق العمود أثناء التنبيذ لكي لا يتشكل الرزاز، وفي حال عدم مرور كامل المحلول عبر العمود بعد التنبيذ للمرة الأولى، يعاد التنبيذ مرة ثانية بسرعة عالية حتى يفرغ كامل العمود، أما الغاية من هذه المرحلة فهي ارتباط الدنا بالغشاءQIAamp membrane الموجود في الـcolumn بينما لا تتثبت البروتينات والمواد الملوثة الأخرى التي قد تثبط تفاعل الـ PCR.
- مرحلة الغسل الأولى: يفتح العمود ويضاف 500 ميكرولتر وقاء AW1 دون ترطيب حواف العمود، تغلق طبقة وينبذ(g ×6000) لمدة دقيقة ثم يوضع العمود في أنبوب جمع 2 مل نظيف ويرمى الأنبوب الذي يحوي الرشاحة.
- مرحلة الغسل الثانية: يفتح العمود بحرص ويضاف 500 ميكرولتر وقاء AW2 دون ترطيب حواف الأنبوب وتغلق الطبقة وينبذ(g×20000)=(14000rpm) لمدة 3 دقائق.

تضمن مرحلتي الغسل الأولى والثانية زيادة نقاوة الدنا المرتبط بغشاء QIAampعن طريق إزالة بقايا العوامل الملوثة.

- ينصح بوضع العمود في أنبوب جمع آخر (2مل) ويرمى الأنبوب الذي يحوي الرشاحة وينبذ بأقصى سرعة لمدة 1 دقيقة.
- المرحلة الأخيرة: وهي مرحلة تمديد الـDNA حيث يوضع العمود في أنبوب (1.5 مل) ويرمى الأنبوب الذي يحوي الرشاحة ثم يفتح العمود ويضاف 200 ميكرولتر وقاء AE أو وقاء التمديد dilution buffer ويحضن بحرارة الغرفة من 1-5 دقائق ثم ينبذ لمدة دقيقة واحدة ($6000\times g$).
- يحتفظ بالمزيج السابق لحين استخدامه في التفاعل السلسلي البوليميرازي كما يمكن إجراء تمديد آخر بوقاء التمديد في حال الضرورة.



الشكل (47) مراحل عزل الـDNA.

2-4-2-2- الطرائق المستخدمة لكشف وتحديد الـ SNP في مورثة الفيكولين2:

استخدم لهذا الغرض طريقتين: الأولى هي تحديد تسلسل الدنا DNA Sequencing**:** حيث ضخمت كامل مورثة الفيكولين 2 في 40 عينة من الشواهد وكذلك الحال الاكزون الثامن في عينات المرضى والشواهد وذلك باستخدام PCR، ومن ثم تحديد تسلسل الدنا فيها، والطريقة الثانية هي TaqMan-Based Real-Time PCR وتم باستخدام هذه الطريقة تحديد التعدد الشكلي في المواقع (-986G>A،-602G>A،-4A>G) الموجودة في منطقة المعزاز من جينة الفيكولين 2 لكل عينات الدراسة.

2-4-2-2-1-تحديد تسلسل DNA: بإتباع الخطوات التالية:

2-4-2-2-1-1-تضخيم مورثة الفيكولين 2:

ضخمت منطقة المعزاز وكامل المناطق المرمزة من مورثة الفيكولين 2 (8kb) على مراحل في 40 عينة عشوائية من الشواهد، بالإضافة للاكزون الثامن لجميع عينات المرضى والشواهد وذلك باستخدام مجموعة من المشرعات التي تغطي اكزون أو اكزونين (الجدول 10) وذلك بعد اختبار المشرعات واختيار درجة الحرارة الأفضل لعمل كل منها أو ما يسمى gradient حيث يجرى التفاعل السلسلي البوليميرازي باستخدام مجال واسع من الحرارة في مرحلة التطويع وبعد الترحيل يتم اختيار درجة الحرارة الموافقة لأفضل عصابة.

	Forward primer	Reverse primer
Promoter + Exon 1	5´- att gaa gga aaa tcc gat ggg- 3´	5´- gaa gcc acc aat cac gaa g- 3´
Exon 2+3	5´- aga tgg cag atg cct ttc ag- 3´	5´- gtt cct ctg cag cca ggt c- 3´
Exon 4+6	5´- agg ccc aga aaa tgg tgt c- 3´	5´- agg ctc ttg tgt tcc agg c- 3´
Exon 5	5´-ata cag acg cct atg gcc c- 3´*	
Exon 7+8	5´- cca gct ccc atg tct aaa gg- 3´	5´- tta caa acc gta ggg cca ag- 3´

الجدول (10) المشرعات المستخدمة في الـ PCR والـ Sequencing،* تشير إلى أن هذه البادئة استخدمت في الـSequencing فقط.

أما طريقة العمل فهي تضخيم 100 نانوغرام من الـDNA الجينومي البشري في أنبوب يضم 25 ميكرولتر من مواد تفاعل الـ PCR التالية:

- 2.5 ميكرولتر من وقاء الـ PCR(X 10) المؤلف من 20 mM Tris pH 8. 8, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ and 0. 1% Triton X-100)

- 5 ميكرولتر من المحلول Q(1 X) من شركة Qia gene
- 0.5 ميكرولتر من $MgCl_2$ أي ما يعادل 0.5 نانومول
- 0.5 ميكرولتر من $dNTP_S$ أي ما يعادل 0.2 نانومول
- 0.5 ميكرولتر من كل بادئة أي ما يعادل 5 بيكومول
- 0.2 ميكرولتر من الـ Taq polymerase أي ما يعادل 1 unit من Qia gene Taq
- 14.1ميكرولتر من H_2O
- 1.5 ميكرولتر من الـ DNA

يتم عادة مزج كمية مناسبة لعدد العينات في أنبوب كبير ثم ينقل إلى كل أنبوب 23.5 ميكرولتر ليضاف إليها الـ DNA بعد ذلك (يتم العمل بوضع مواد وأنابيب العمل على الثلج لتجنب تخرب إنزيم البوليميراز) بعد إضافة عينات الـDNA تنبذ الأنابيب لضمان مزج الدنا مع مكونات التفاعل الأخرى، ثم تنقل الأنابيب إلى جهاز الدوار الحراري Thermocycler (جهاز الـ PCR) من شركة Applied Biosystem ويثبت البرنامج الخاص بتضخيم الدنا بشروط التضخيم التالية:

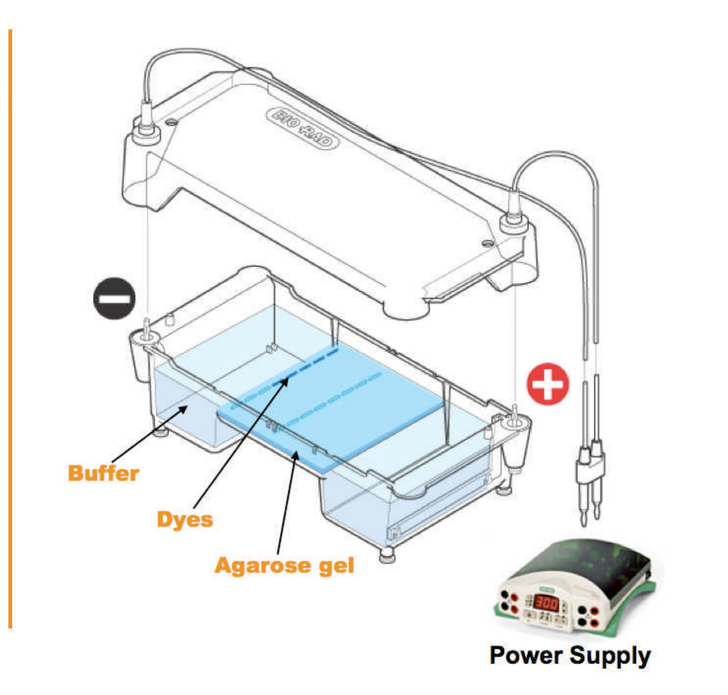
- 95^o لمدة 5 دقائق.
- 35 دورة تتألف كل دورة من (95^o لمدة 40 ثانية ثم 59^o لمدة 60 ثانية ثم 72^o لمدة 90 ثانية).
- 72^o درجة لمدة 3 دقائق.
- 15^o درجة لمدة 10 دقائق.

طبق البرنامج السابق على كل الاكزونات مع تبديل درجة حرارة التطويع حسب البادئات المستخدمة.

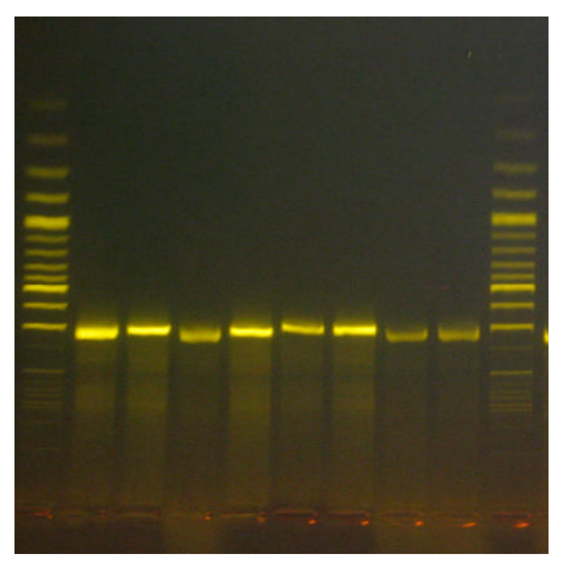
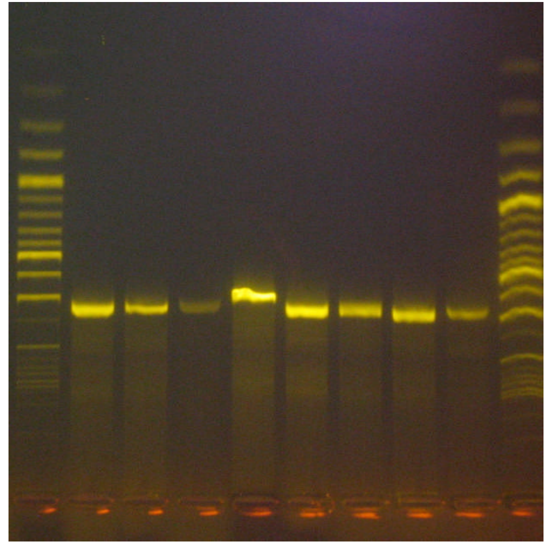
2-4-2-2-1-2- الرحلان الكهربي Electrophoresis:

رحلت نواتج الـ PCR ولونت بالـ Sygreen I (Biozym Diagnostik GmbH, Wien, Austria) والـ dimethyl sulfoxide بتمديد واحد من السيبرغرين (مادة مفلورة) إلى 150 حجم من دي ميتيل سلفوكسيد، حضر في البداية هلام الأغاروز بتركيز1-1.5% حسب طول قطع الدنا المضخمة حيث يحل الوزن المناسب من مسحوق الآغاروز بوقاء الـ TBE(Tris-acetate Buffer EDTA) ويذوب المزيج بالميكروويف، ثم يصب بحوض الترحيل المناسب وعند تصلب الجيل ينقل إلى حوض ليغمر بالوقاء، قبل نقل العينات إلى ثقوب الفصل يمزج 5 ميكرولتر من منتجات الـ PCR مع 5 ميكرولتر من المزيج التالي (1ميكرولتر سيبرغرين +

1.5 ماء+2.5 وقاء تحميل Loading buffer) ويوضع في كل ثقب عينة ويوضع بالثقب الأول العلام marker (5ميكرولتر من العلام +5 ميكرولتر من المزيج السابق)، بعد وصل الأقطاب يتم الترحيل بتوتر 90 فولط حتى قبل نهاية الجيل بـ 2 سم وأخيرا يتم إظهار العصائب بالأشعة فوق البنفسجية ثم يصور الجيل بكاميرا رقمية موصولة مباشرة إلى الحاسب ليتم تخزين الصورة ومعالجتها.



الشكل (48) طريقة إجراءالرحلان الكهربي على هلام الأغاروز .

الشكل (49) رحلان كهربي على هلام الأغاروز لنواتج الـ PCR.

2-4-2-2-1-3- تنقية نواتج الـ PCR Purification of PCR products :

تمت تنقية نواتج الـ PCR باستخدام كيت NucleoSpin® Extract II من شركة Macherey -Nagel GmbH-ألمانيا.

المواد والأجهزة اللازمة:

- إيثانول 96-100%.
- أنابيب ابندروف سعة 1.5 مل.
- رؤوس ميكروببيت.
- منبذة وأنابيب تنبيذ.
- محم حراري.
- دوارة vortex.
- تجهيزات حماية خاصة (لباس مخبري، قفازات، نظارات حماية).

أما الهدف من التنقية فهو التخلص من بقايا البادئات و$dNTP_S$ في نواتج الـ PCR وذلك بآلية الترشيح المستدق ultra filtration عبر الغشاء الموجود في العمود بإتباع الخطوات التالية:

1- يضاف 200 ميكرولتر من Binding Buffer (NT) إلى نواتج الـ PCR ويوضع الناتج بمحم حرارته 50^o درجة لمدة 5-10 دقائق.

2- ينقل الناتج إلى عمود موضوع فوق أنبوب 2 مل وينبذ(g × 11000) لمدة 1 دقيقة، إذ يرتبط الـ DNA في هذه المرحلة على غشاء السيليكا الموجود في NucleoSpin® Extract II Columns.

3- ترمى الرشاحة من المرحلة السابقة ويغسل العمود لإزالة المواد الملوثة كالأملاح والمركبات كبيرة الجزيئات، يضاف للعمود 600 ميكرولتر من وقاء الغسل الممدد بالإيثانول ethanolic wash buffer (NT3) وينبذ (g × 11000) لمدة 1 دقيقة

4- ترمى الرشاحة ويعاد تنبيذ العمود من أجل التجفيف بنفس القوة السابقة ولمدة دقيقتين.

5- يمدد الـ DNA بإضافة 15-50 ميكرولتر من محلول التمديد NE إلى العمود ويترك بحرارة الغرفة لمدة 1 دقيقة ثم ينبذ العمود(g × 11000) لمدة 1 دقيقة.

6- يرمى العمود ويحتفظ بالرشاحة وهي الـ template القالب من أجل إجراء الـ cycle sequencing.

PCR clean-up, Gel extraction

Protocol-at-a-glance (Rev. 08)

NucleoSpin® Extract II

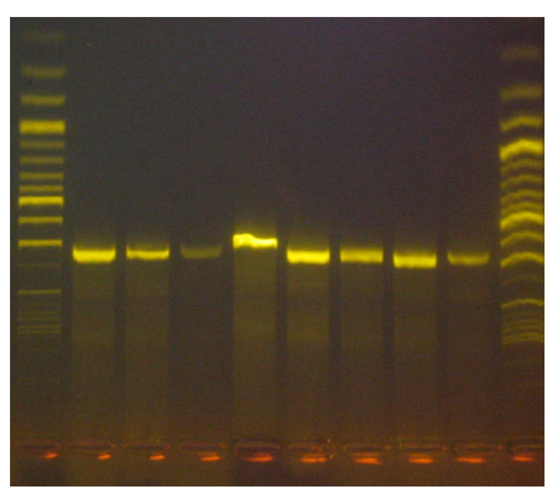
	Gel extraction	PCR clean-up
1 Gel extraction: Excise DNA fragment / Solubilize gel slice PCR clean-up: Adjust binding condition	200 µl NT / 100 mg gel 50°C 5 - 10 min	200 µl NT / 100 µl PCR
2 Bind DNA	1 min 11,000 x *g*	
3 Wash silica membrane	700 µl NT3 1 min 11,000 x *g*	
4 Dry silica membrane	2 min 11,000 x *g*	
5 Elute DNA	15 - 50 µl NE RT 1 min 1 min 11,000 x *g*	

الشكل (50) مراحل تنقية نواتج الـ PCR.

2-4-2-2-1-4- تحضير العينات من أجل الـ Cycle Sequencing:

1- التحقق من جودة الـ DNA القالب Determining DNA Template Quality كما يلي:

- يجرى رحلان كهربي لمنتجات الـ PCR التي نقيت في المرحلة السابقة على جيل الأغاروز حيث يجب أن يعطي الـ DNA المنقى عصابة واحدة (شكل51)، يكشف الرحلان التلوث بالـ DNAs والـRNAs ولكن لا يكشف التلوث بالبروتين .



الشكل (51) رحلان كهربي لنواتج الـ PCR بعد التنقية حيث تظهر عصابة واحدة.

- قياس نقاوة الـ DNA القالب وهي نسبة قياس الطيف الضوئي Spectrophotometry A260/A280 وتجرى بواسطة جهاز الطيف الضوئي أو جهاز الـ Nanodrop (شكل 52) حيث يجب أن تكون النقاوة بين 1.7-1.9 إذ تشير النسب الأقل إلى تلوث بالبروتينات أو مواد كيميائية عضوية، بينما لا تكشف هذه الطريقة التلوث بالـ DNA والـ RNA.



الشكل (52) قياس تركيز و نقاوة الـ DNA بواسطة جهاز الـ NanoDrop.

هذا ومن الضروري إشراك الطريقتين معا قبل إجراء تفاعل الـ cycle sequencing مع أنه لا تكشف أي من هاتين الطريقتين التلوث بالأملاح لذلك عند الشك بتلوث الـ DNA بالأملاح يجب إزالتها قبل إجراء التفاعل باستخدام كيتات خاصة.

2- قياس كمية الـ DNA Template Quantity DNA

يعتبر قياس كمية الـ DNA أمرا حاسما قبل إجراء التفاعل وذلك من أجل إضافة المقدار المناسب لتفاعل Cycle Sequencing للحصول على طول نواتج الـ PCR المطلوب (الجدول 11).

ويتم ذلك أيضا بقياس الطيف الضوئي للعينة بطول الموجة 260 نانومتر بواسطة جهاز الطيف الضوئي أو الـ Nanodrop .

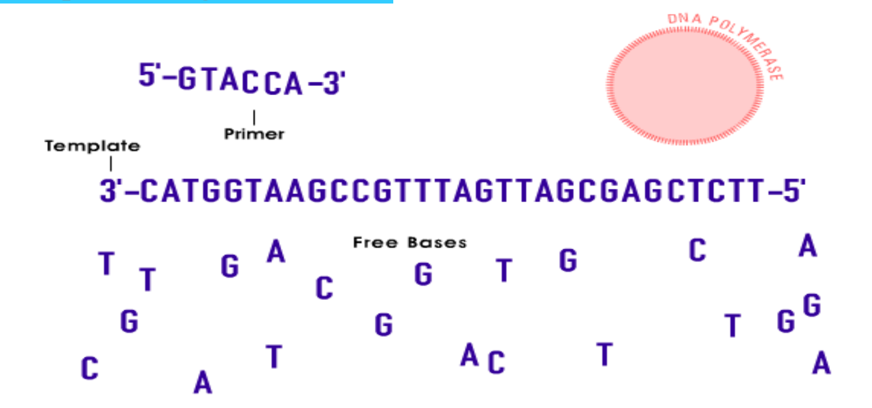
كمية الـDNA الواجب إضافتها	طول نواتج الـ PCR
1–3 ng	100–200 bp
3–10 ng	200–500 bp
5–20 ng	1000–2000 bp
10–40 ng	>2000 bp

الجدول (11) كمية الـ DNA القالب الواجب إضافتها لتفاعل الـ cycle sequencing وذلك حسب طول نواتج الـ PCR.

2-4-2-2-1-5- تفاعل تحديد التسلسل النوكليوتيدي Cycle Sequencing:

المواد اللازمة من أجل إجراء الـ cycle sequencing

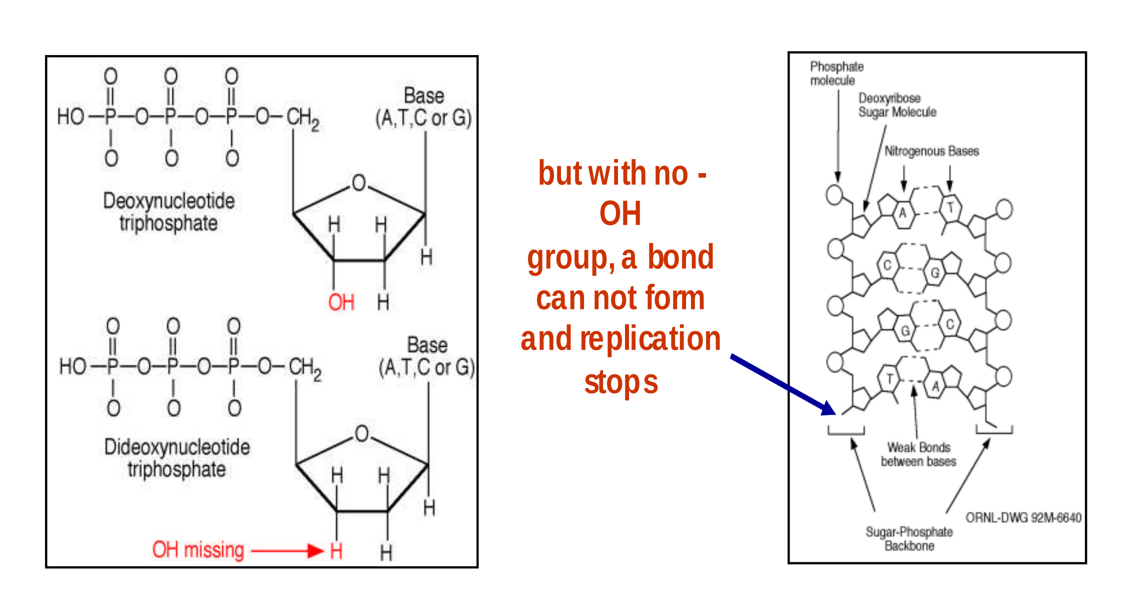
- الـ DNA القالب أو الـ template
- إنزيم الـ Polymerase
- deoxynucleotides dNTPs
- dideoxynucleotides ddNTPs
- H2O
- المشرع



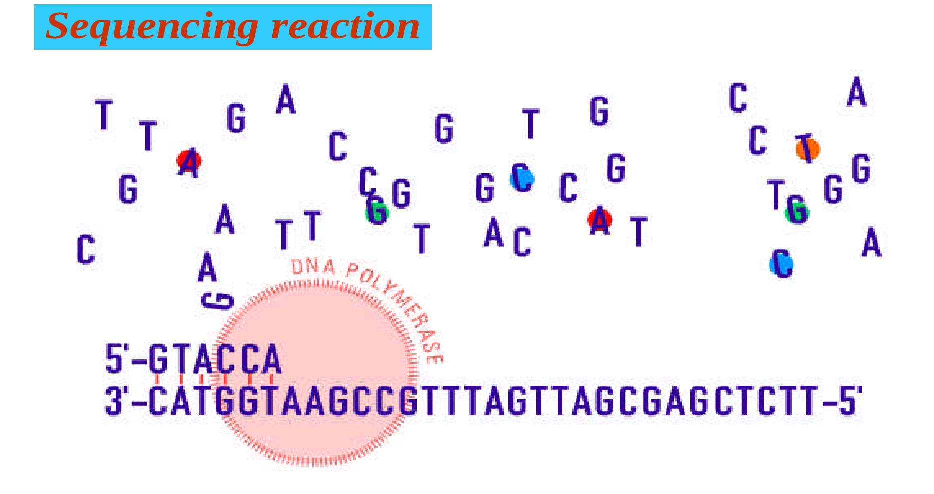
الشكل (53) مكونات تفاعل الـ Cycle Sequencing.

مبدأ التفاعل: ويعتمد على مبدأ Sanger إذ يجرى تفاعل الـ PCR بوجود نوكليوتيدات مفلورة تشبه النوكليوتيدات الطبيعية ولكنها تفتقد للزمرة OH الذي يؤدي إلى إيقاف السلسلة (الشكل

54)، ويتم في هذا التفاعل مسخ شريطي الـ DNA بالحرارة 95° كمرحلة أولى ثم يرتبط المشرع مع السلسلة المتممة بالحرارة 50° لتبدأ بعدها البوليميراز بإطالة المشرع بالحرارة 60° (الشكل 55)، وتتوقف إطالة السلسلة عندما يندخل ddNTPs في هذه العملية (الشكل 56)، مما يجعل السلسلة تنتهي بأساس موسوم ليتشكل بالنهاية قطع عديدة تختلف فيما بينها بأساس واحد موسوم (الشكل 57) والذي يمكن من فصلها بحسب أوزانها الجزيئية بالرحلان الكهربي عبر جهاز الـ3100 Sequencer analyzer.

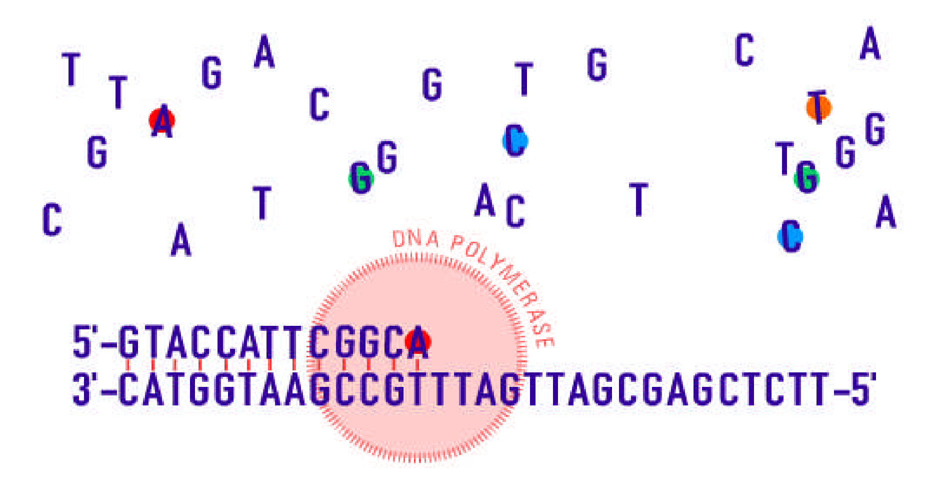


الشكل (54) الفرق بين بنية الـdNTPs و الـ ddNTPs.



الشكل (55) تطويع المشرع مع الـ DNA القالب.

Sequencing reaction



الشكل (56) توقف إطالة السلسلة بسبب وجود ddNTPs.

Sequencing reaction



الشكل (57) القطع الناجمة عن الـCycle sequencing.

طريقة العمل: أستخدم كيت (BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). المخزن بالحرارة من -15º إلى -25º حيث يوضع بكل أنبوب المواد التالية:

- 2 ميكرولتر من وقاء Big Dye (x5).
- 1 ميكرولتر من Big Dye (x10).
- 0.5 من المشرع ذي التركيز 10 بيكومول.

- الدنا القالب حسب طول نواتج الـ PCR المراد الحصول على تسلسلها كما في (الجدول 11).
- يكمل الحجم حتى 10 ميكرولتر بالـ H_2O.

أما مراحل الـ cycle sequencing داخل جهاز الدوار الحراري فهي:

مسخ الـDNA بالحرارة96^o لمدة 10 ثواني ثم التطويع بالحرارة 50^o درجة لمدة 5 ثواني وأخيرا الإطالة بالدرجة 60^o لمدة 4 دقائق، تعاد هذه المراحل 25 دورة.

2-4-2-2-1-6- التنقية بعد تفاعل تحديد التسلسل النوكليوتيدي:

الهدف من هذ المرحلة هو التخلص من dye terminators غير المرتبطة قبل ترحيل العينة عبر الـ sequencer، حيث أن الـ dye terminators الزائدة تسبب غموض في الأسس في الجزء الأول من الـsequence ويمكن أن تتدخل في تسمية الأسس أيضا.

الأدوات والمواد اللازمة:

- H_2O.
- أنابيب فالكون سعة 50 مل.
- أنابيب فارغة 2مل.
- أنابيب ابندروف 1.5 مل.
- سيفادكس.

طريقة التنقية:

- يحل 1غ من بودرة السيفادكس في 15 مل H_2O ويدور على الـ vortex ويترك الأنبوب بشكل عمودي لمدة 30 دقيقة.
- يوضع 800 ميكروليتر من السيفادكس في عمود Centri-Sep™ spin columns خاص لتنقية السيفادكس من شركة Applied Biosystems (P/N CS-901). ويوضع هذا العمود فوق أنبوب فارغ.
- ينبذ لمدة 3 دقائق (3000× g).
- يوضع العمود فوق أنبوب إبندروف جديد ويوضع فوقه نواتج الـ PCR sequencing.
- ينبذ لمدة 3 دقائق (3000× g).
- يرمى العمود ويحتفظ بأنبوب الابندروف مع الرشاحة الموجودة داخله بحرارة -20^o لحين إدخال العينة لجهازالـ3100 Sequencer analyzer.

يمزج 10 ميكرولتر من نواتج المرحلة السابقة مع 10 ميكرولتر من الفورماميد منزوع الايونات Hi-Di™ Formamide Highly deionized formamide من شركة (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) تمهيدا للمرحلة المقبلة.

2-4-2-2-1-7- الكشف على جهاز الـ Sequencer analyzer 3100:

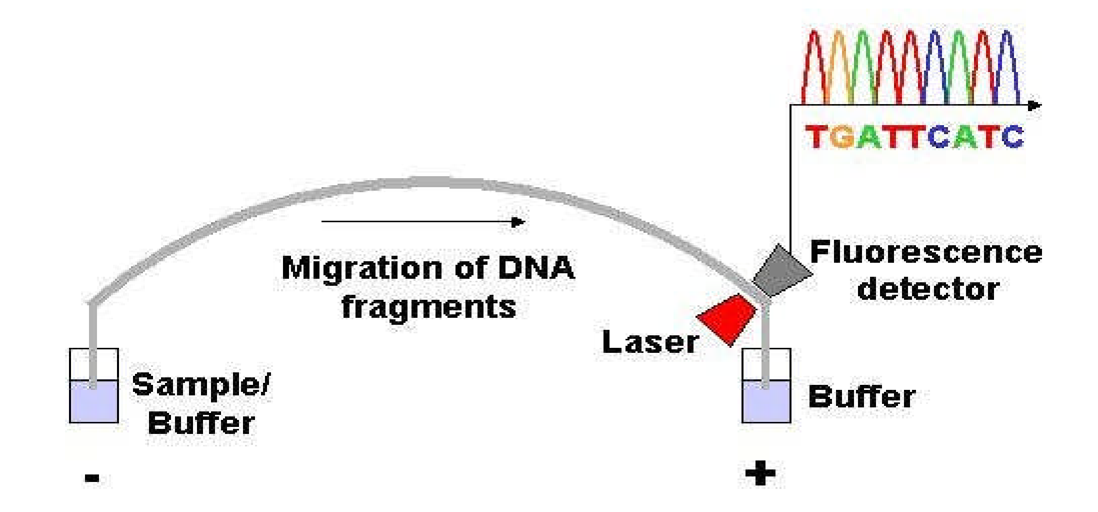
توضع العينات في أنابيب خاصة أو صفائح خاصة ذات غطاء مطاطي (الشكل 58) وذلك في صينية ضمن معيان ذاتي autosampler في جهاز تحديد تسلسل الدنا Sequencer analyzer (الشكل 59) حيث يحضر هذا المعيان بالتسلسل كل عينة لتكون بتماس مع المهبط و نهاية الأنبوب الشعري capillary المملوءة بالمكثورpolymer، بينما المصعد في النهاية الأخرى لهذا الأنبوب مغمور بالوقاء، يدخل جزء من العينة إلى الأنبوب الشعري ويسري تيار من المهبط إلى المصعد وهذا ما يسمى الحقن الكهربائي عندها يحرك المعيان الذاتي مستودع الوقاء لتدخل النهاية الأخرى للأنبوب الشعري بالقرب من المهبط إلى الوقاء، يطبق تيار كهربائي لمرة ثانية لمتابعة الرحلان عبر المكثور، وعندما تصل قطع الـ DNA المعلمة (الموسومة) إلى نافذة الكشف detector window يثير الليزر الأصبغة الموسومة dye labels المندخلة في الدنا عندها تقود سلسلة من العدسات وتركز التألق إلى مخطاط الطيف (راسم طيفي) spectrograph، بينما يقوم حزيز الانعراج (زجاج محزز) diffraction grating في مخطاط الطيف ببعثرة الضوء (يوزعه بالاعتماد على أطوال الموجات)، ويركز طيف الضوء الناتج إلى منظومة كاميرات charge coupled device camera CCD (الشكل 60)، وبما أن كل نوكليوتيد مفلور يملك لونا خاصا به فإن برنامج تحليل البيانات الموجود داخل جهاز الـ sequencer يحدد ترتيب الأسس الموجودة على الهلامة المستخدمة وبذلك تتم عملية تحديد التتابع النوكليوتيدي لقطعة الدنا الهدف (الشكل 61).



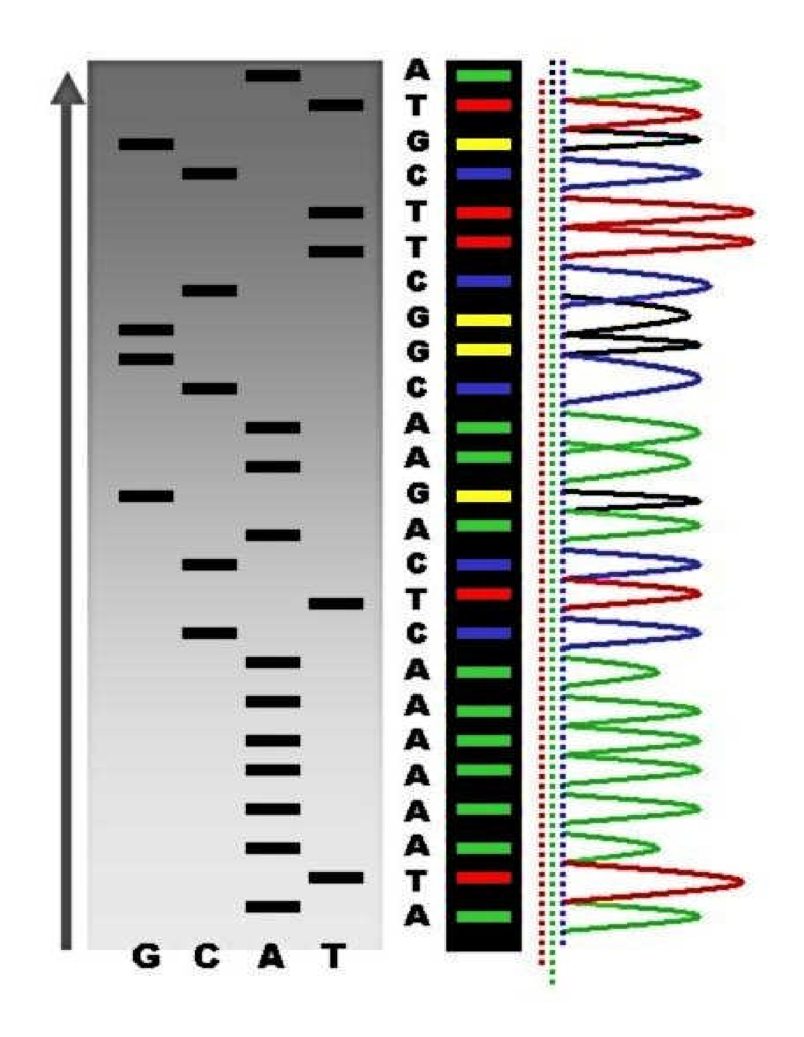
شكل (58) الصفيحة الخاصة بوضع العينات.



الشكل (59) جهاز الـABI Prism 3100 Genetic Analyzer,Applied Biosystems
من الداخل.

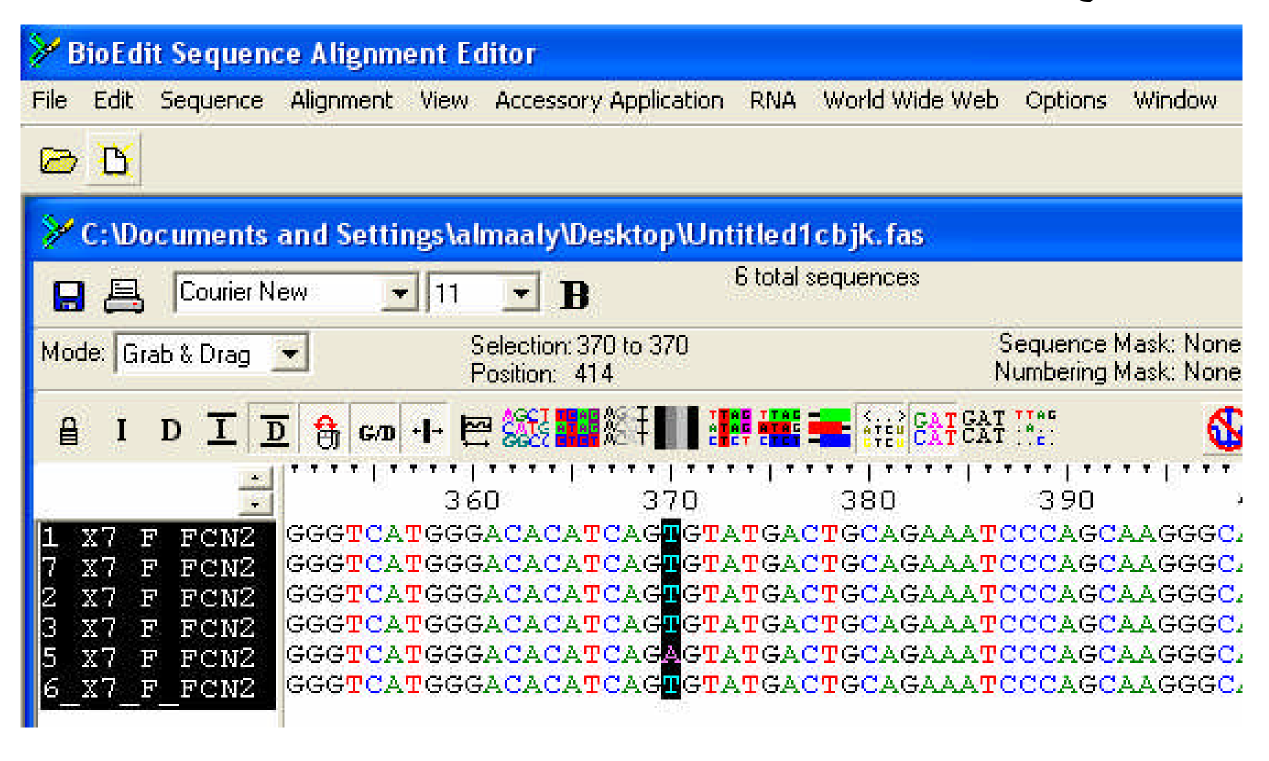


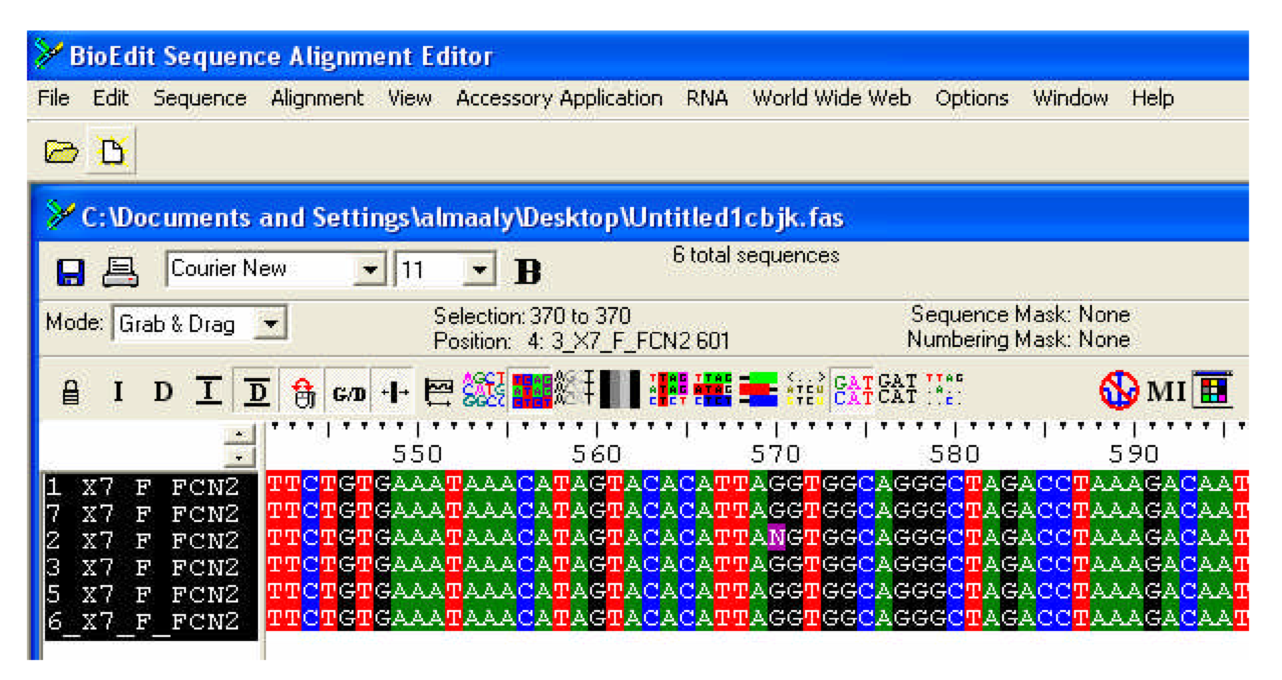
الشكل (60) طريقة التعرف على الأسس الأزوتية داخل جهاز Sequencer analyzer 3100.



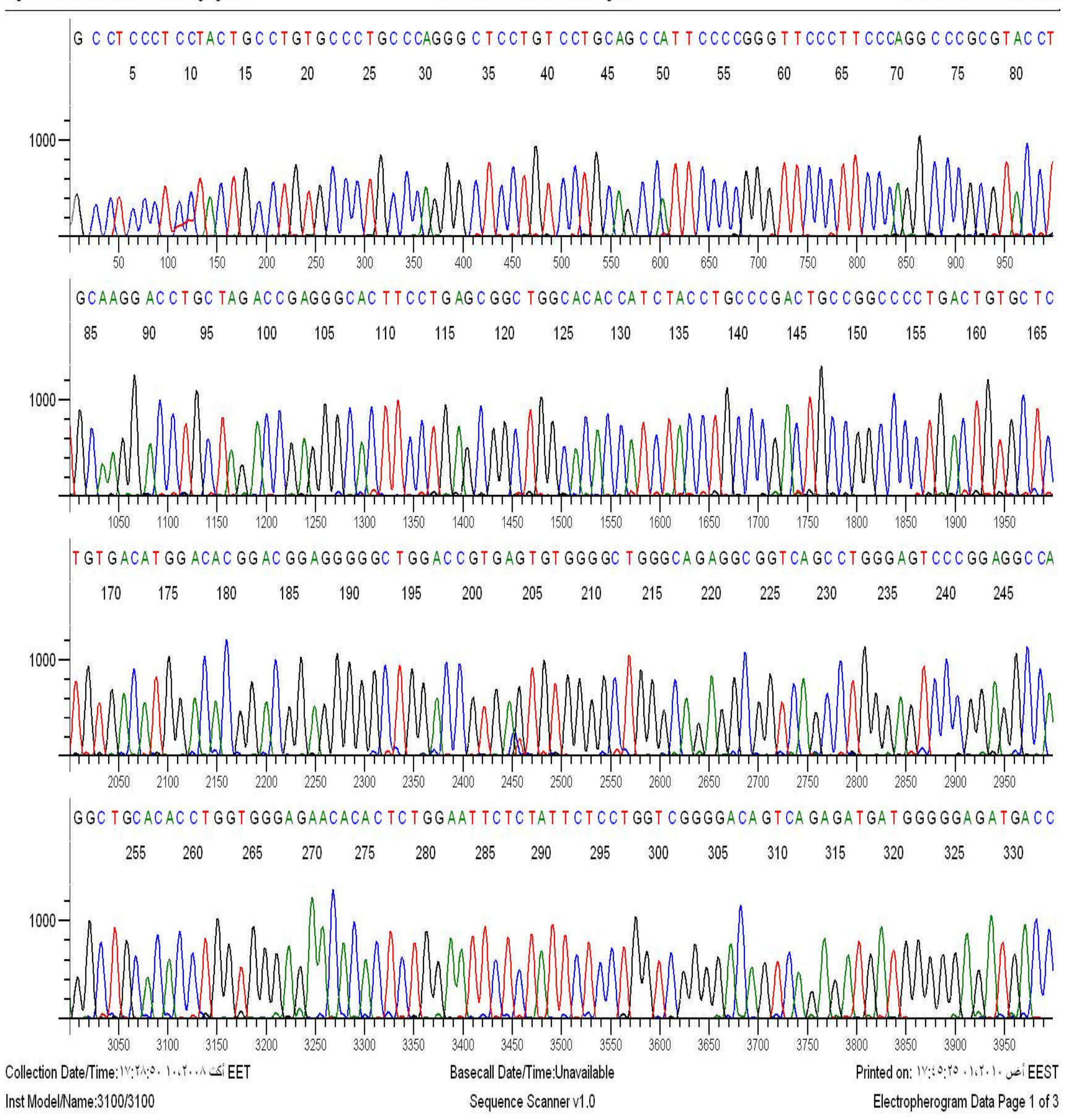
الشكل (61) نتاج تسلسل الـ DNA.

2-4-2-2-1-8- ترصيف تسلسل الـ DNA الناتج: وذلك باستخدام برنامج الـ Bio-Edit والتأكد من التعدد الشكلي عيانيا من مخطط الرحلان الكهربي electrophoregram للأسس الأزوتية الناتج.

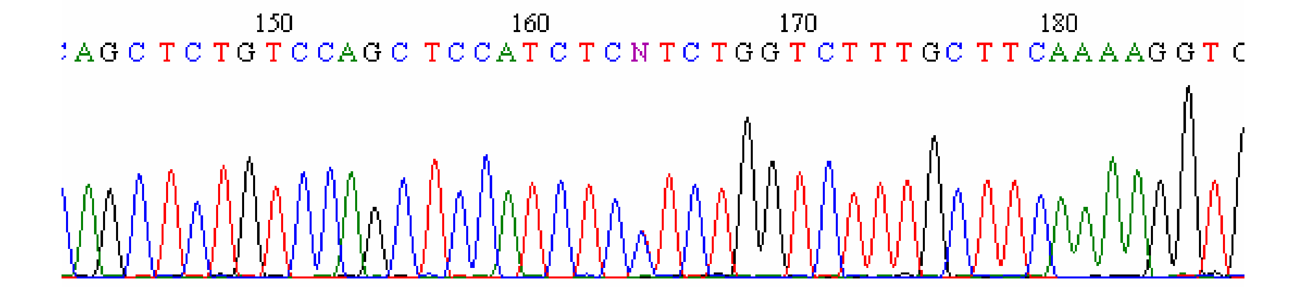


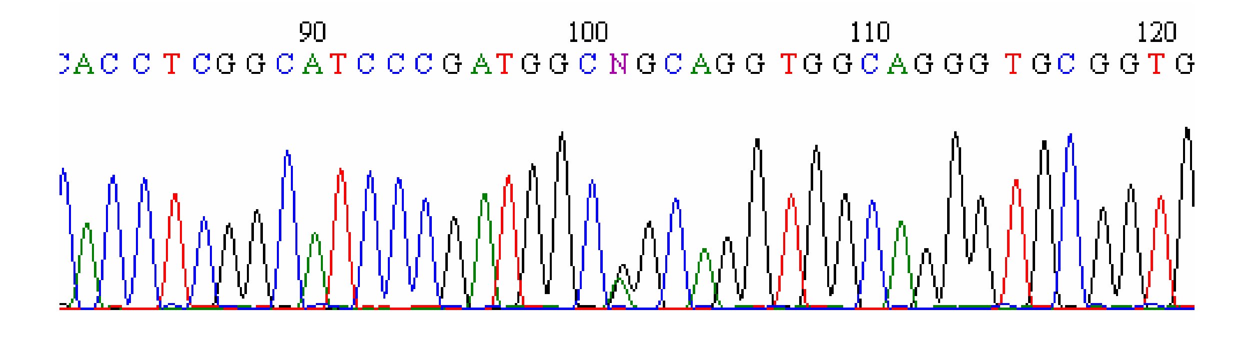


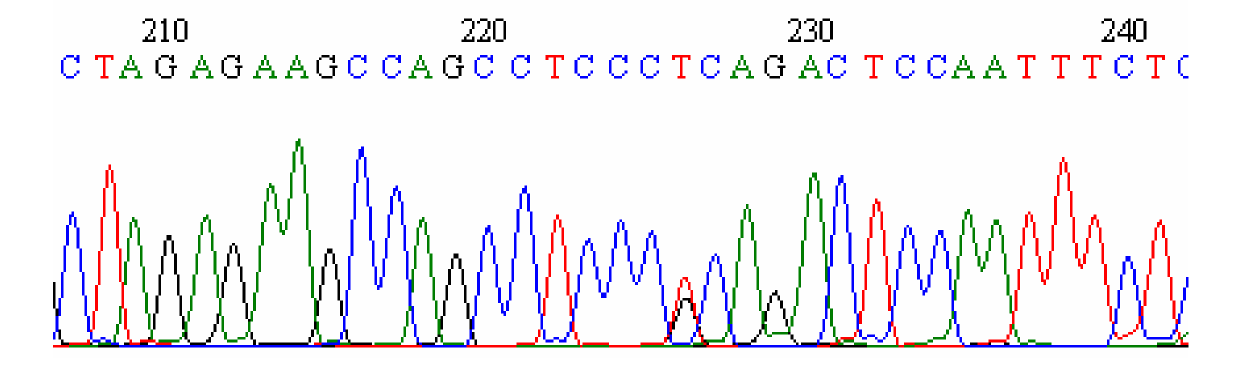
الشكل (62) ترصيف تسلسل الـ DNA لعدة عينات باستخدام برنامج الـ Bio-edit ومقارنتها مع المرجع.



الشكل (63) مثال عن مخطط الرحلان الكهربي للأسس.





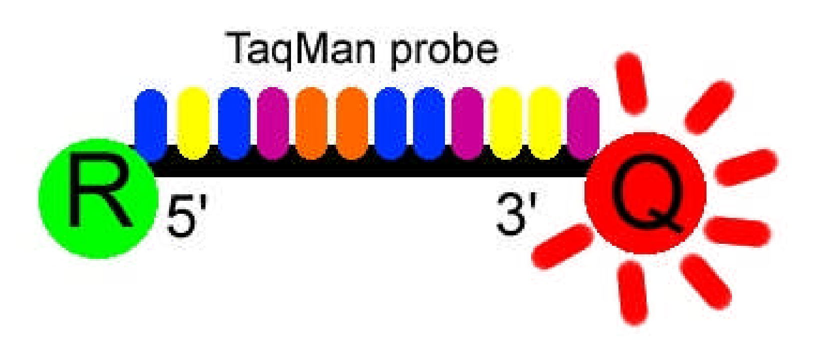


الشكل (64) أشكال مختلفة من الـ SNP.

2-4-2-2-2-Real-Time PCR :

حدد التعدد الشكلي في المواقع (-986G>A،-602G>A،-4A>G) في منطقة المعزاز باستخدام TaqMan-Based Real-Time PCR (TaqMan MGE assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

بنية مسبار الـ TaqMan: يتركب المسبار من 20-30 نوكليوتيد يضم صبغ مرسل reporter dye على النهاية ́5 وصبغ مخمد quencher dye على النهاية ́3 (الشكل 65)، الصبغ المعطي أو المرسل للتألق الموجود على النهاية ́5 هو FAM™ وتركيبته (6-carboxyfluorescein) كما يمكن استخدام TET™ أو VIC™ أو HEX™، أما الصبغ المخمد في النهاية ́3 فهو TAMRA™ وتركيبته (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) ويمكن استخدام YAK أو BHQ أو JOE، هذا وإن وجود مجموعة الفوسفات على النهاية ́3 تمنع إطالة المسبار.

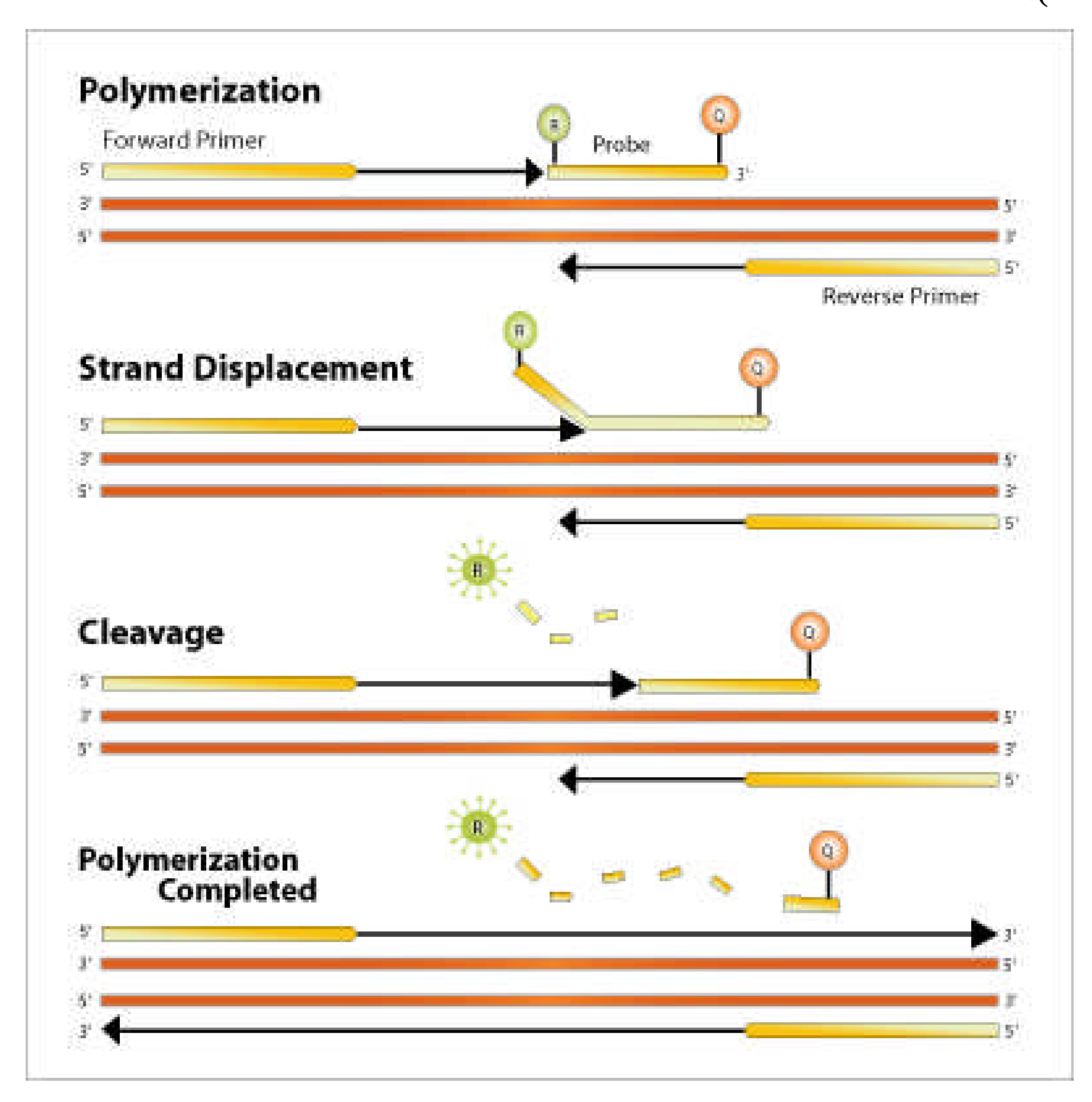


الشكل (65) بنية مسبار الـTaqman ،تمثل الكرة الحمراء الصبغ المخمد الذي يعطل إشارة الصبغ المرسل عندما يكون قريب منه.

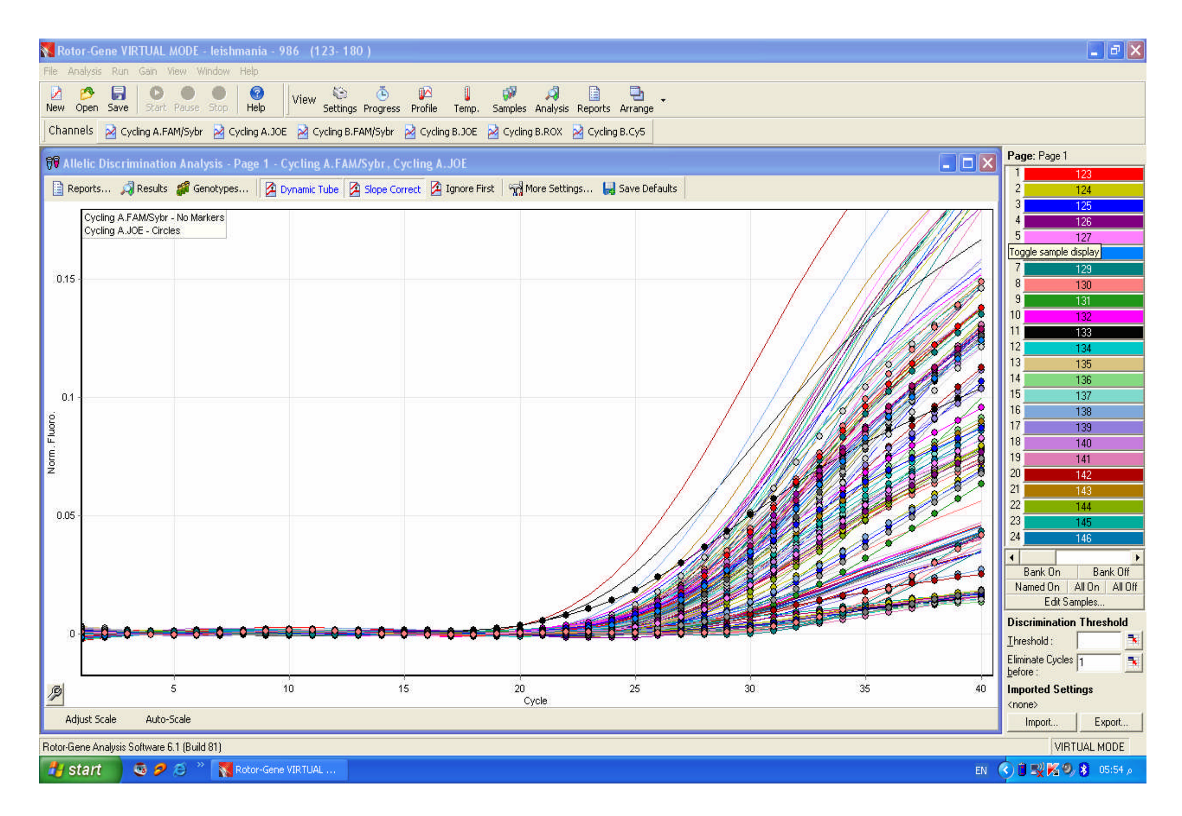
مبدأ Real Time-PCR: يعتمد الـ RT-PCR على فعالية النوكلياز في النهاية ́5 من بوليميراز الـ DNA لشطر مسبار TaqMan خلال الـ PCR.

عندما يكون المسبار خاملا يكون الجزء الداني من الصبغ المرسل قريبا من الصبغ المخمد مما ينجم عنه تثبيط تألق الصبغ المعطي، خلال الـ PCR وفي دور التطويع ترتبط البادئتين الأمامية والخلفية بالـDNA الهدف، وكذلك الحال يرتبط المسبار بين موقع ارتباط البادئتين وعندما يبدأ الإنزيم بإطالة البادئة ويصل إلى المسبار فإنه يأتي دور فعالية النوكلياز من النهاية (́3 → ́5) لإنزيم الـTaq، فتشطر المسبار بين الصبغ المرسل والمخمد (يتدرك المسبار فيتحرر المرسل من الفعالية المخمدة للصبغ المخمد) (الشكل 66)، وعندها تبدأ أجزاء من المسبار بالانزياح عن الهدف فيزداد التألق وتستمر البلمرة أما النهاية ́3 للمسبار تقفل لمنع إطالته خلال الـ PCR، تحدث هذه العملية في كل دورة و لا يتداخل التراكم الأسي لنواتج الـ PCR، يكشف ويقاس التألق

إذ يكون مقداره مرتبط بشكل مباشر ومتناسب مع كمية الـ DNA الموجودة في التفاعل ثم يجمع الحاسب بيانات التألق ويحللها باستخدام برنامج معين ليتم عرض النتائج بشكل مخططات (الشكل 67).

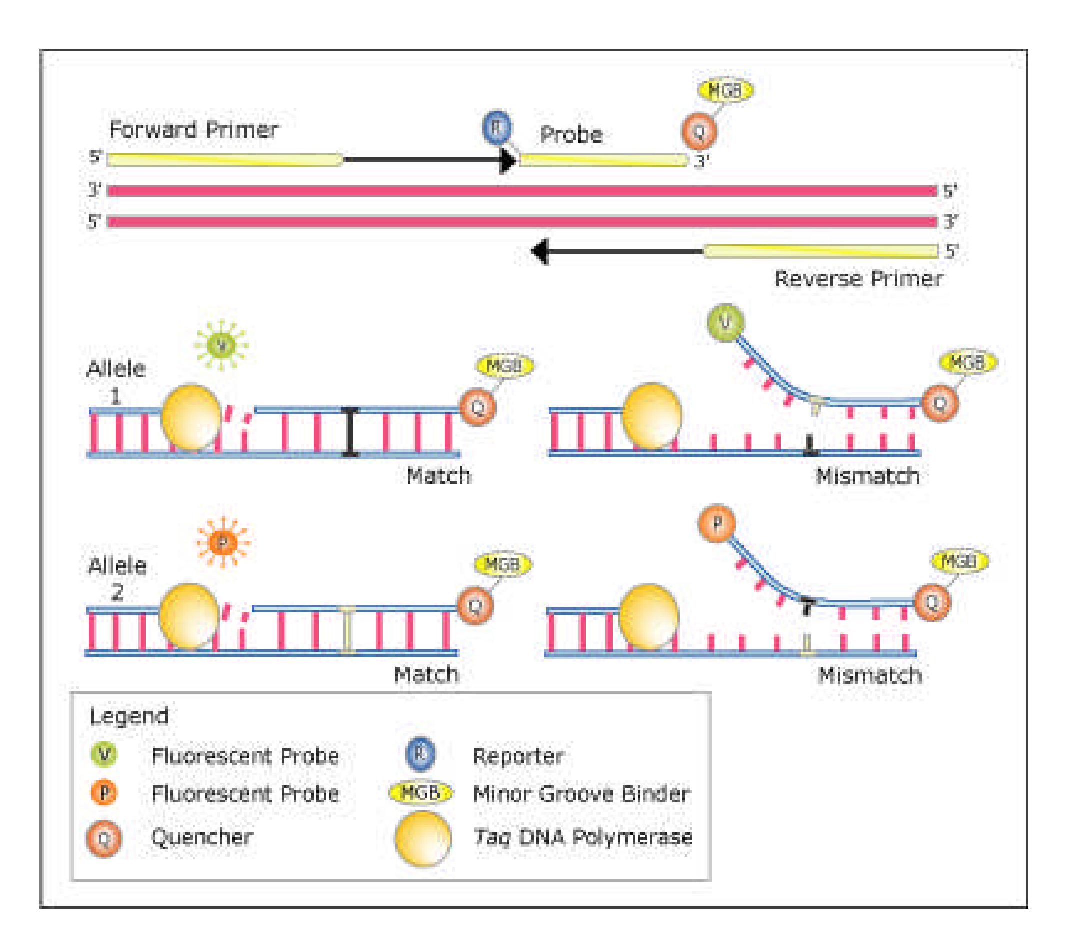


الشكل (66) مبدأ عمل الـ Real-Time PCR.



الشكل (67) كيفية نقل البيانات إلى منحنيات من التألق.

استخدام الـTaqMan في كشف الـ SNP: استخدم الـTaqMan لكشف الطفرات حيث صمم لكل أليل مسبار خاص موسوم بمادة مفلورة مختلفة وكل مسبار مصمم ليكون مكملا لسلسلة أليل واحدة وليس للأخرى، أي أن أحد المسبارين يكشف النمط البري والآخر يكشف الطفرة، وعادة ما يكون الفرق بالمسبارين زوج أسس bp فقط، وبما أن الفرق بين المسبارين قليل جدا فمن المفيد استخدام شروط تفاعل مضبوطة، ولذلك ولزيادة الحساسية يستخدم حاليا نمط جديد من تاك مان سمي Minor Groove Binder (MGB) TaqMan probe (الشكل 68) وهذا المسبار يشبه TaqMan التقليدي ولكن أضيف إليه جزء محزم (ممسك) ذو ثلم صغير على النهاية َ3 يعمل على تثبيت التطويع إلى الـDNA القالب، مما يسمح باستخدام مسبار أقصر (حتى 13 bp) والمسبار القصير أكثر حساسية لإزالة (فك تثبيت) الارتباط غير الملائم لزوج أساسي وحيد، مما يجعل MGB أفضل من التاك مان التقليدي للتطبيقات التي تتطلب التمييز بين أهداف لها تسلسل متشابه.



الشكل(68) بنية مسبار الـ Taqman ذو الـ MGB.

2-4-2-2-2-1- طريقة العمل:

استخدم في كل تفاعل لكشف الأليل:

- 12.5 µl من TaqMan Universal Master Mix
- 2 µl من البادئة الأمامية ذات التركيز 5 ميكرومول/ل
- 2 µl من البادئة الخلفية ذات التركيز 5 ميكرومول/ل
- 1 µl من المسبار الموسوم بـ FAM ذو التركيز 10 ميكرومول/ ل
- 1 µl من المسبار الآخر الموسوم بـ YAK ذو التركيز 10 ميكرومول/ ل
- 50 نانوغرام من الـDNA منحلة في 6.5 ميكرولتر من H_2O

واستخدمت أنابيب بحجم 0.1 مل من شركة

(Corbett Research LTF-Labortechnik GmbH, Wasserburg, Germany

أضيف لكل تشغيل run:

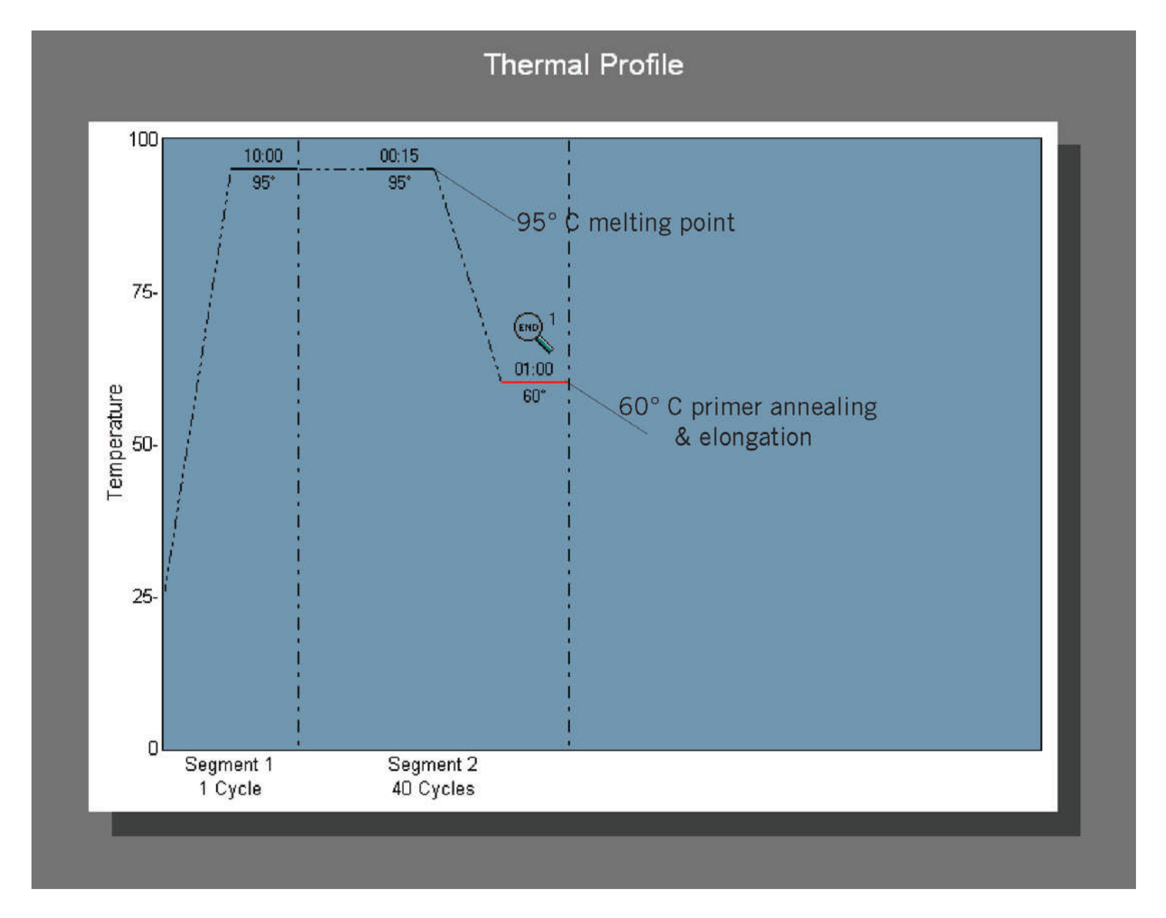
- 2 Non Template Controls (NTC) أي شواهد سلبية بدون دنا لكشف التلوث الذي قد يعطي نتائج ايجابية كاذبة.

- 2 شواهد سلبية Negative controls (عينات تحوي دنا معروف عنها أنها سلبية).
- 2 شاهد إيجابي Positive control (عينة ذات دنا ايجابي الأولى للأليل الأول والثانية ايجابية للأليل الثاني) وعندما يعطي الشاهد الايجابي تألق هام يعني أن النتيجة السلبية في العينات المجهولة هي سلبية حقيقية وليست نتيجة لفشل التفاعل لسبب في المسبار ،المشرع، الوقاء، أو البوليميراز.

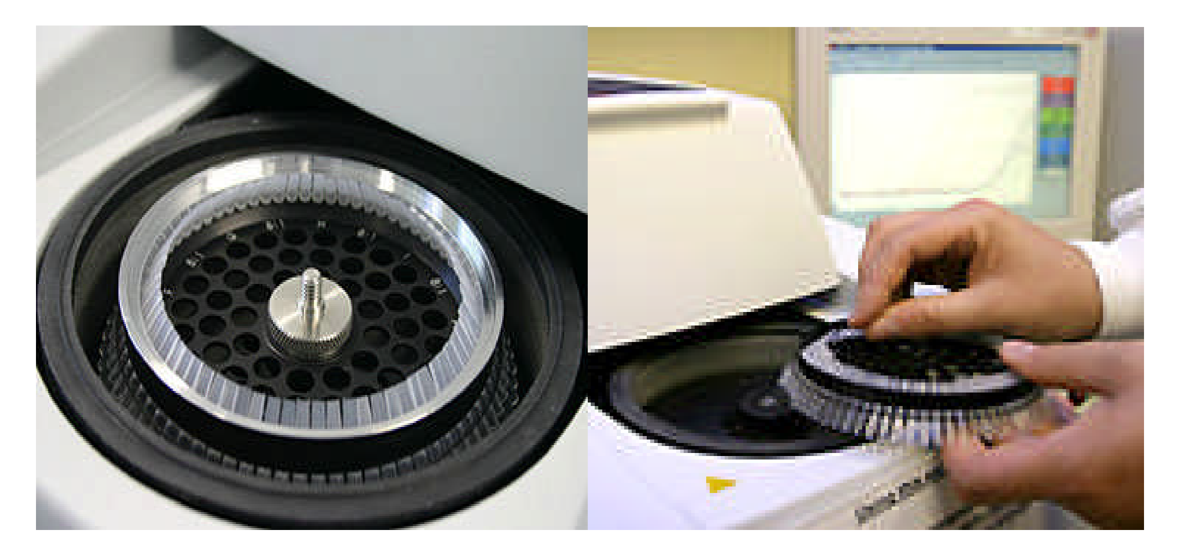
2-4-2-2-2-2- مراحل الاختبار:

- مرحلة تفعيل البوليمبراز بالحرارة 95° لمدة 10 دقائق
- 40 دورة كل دورة مؤلفة من مرحلتين (مسخ الدنا بحرارة 95° لمدة 60 ثانية متبوعة بدقيقة من التطويع والتطويل بحرارة 60° درجة أيضا (الشكل 69).

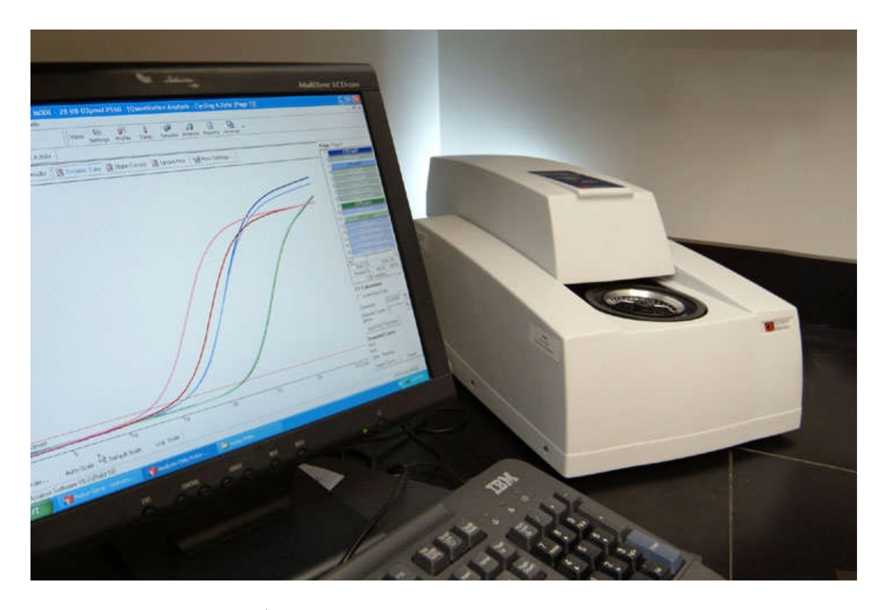
يجب لفت الانتباه إلى أن المسبار مصمم بحيث تكون درجة حرارة تهجين المسبار أعلى من المشرع بـ8-10 درجات هذا يضمن تهجين المسبار قبل أن يحصل التطويل مع البادئة هكذا سيكون هناك زيادة متناسبة في التألق لكل نسخة مضخمة تم إنتاجها.



الشكل (69) مرحلتي الـ Real Time PCR المستخدمة في TaqMan RT- PCR



الشكل (70) كيفية وضع العينات في قرص الجهاز ذو السعة 72 أنبوب سعة الأنبوب0.1 مل.



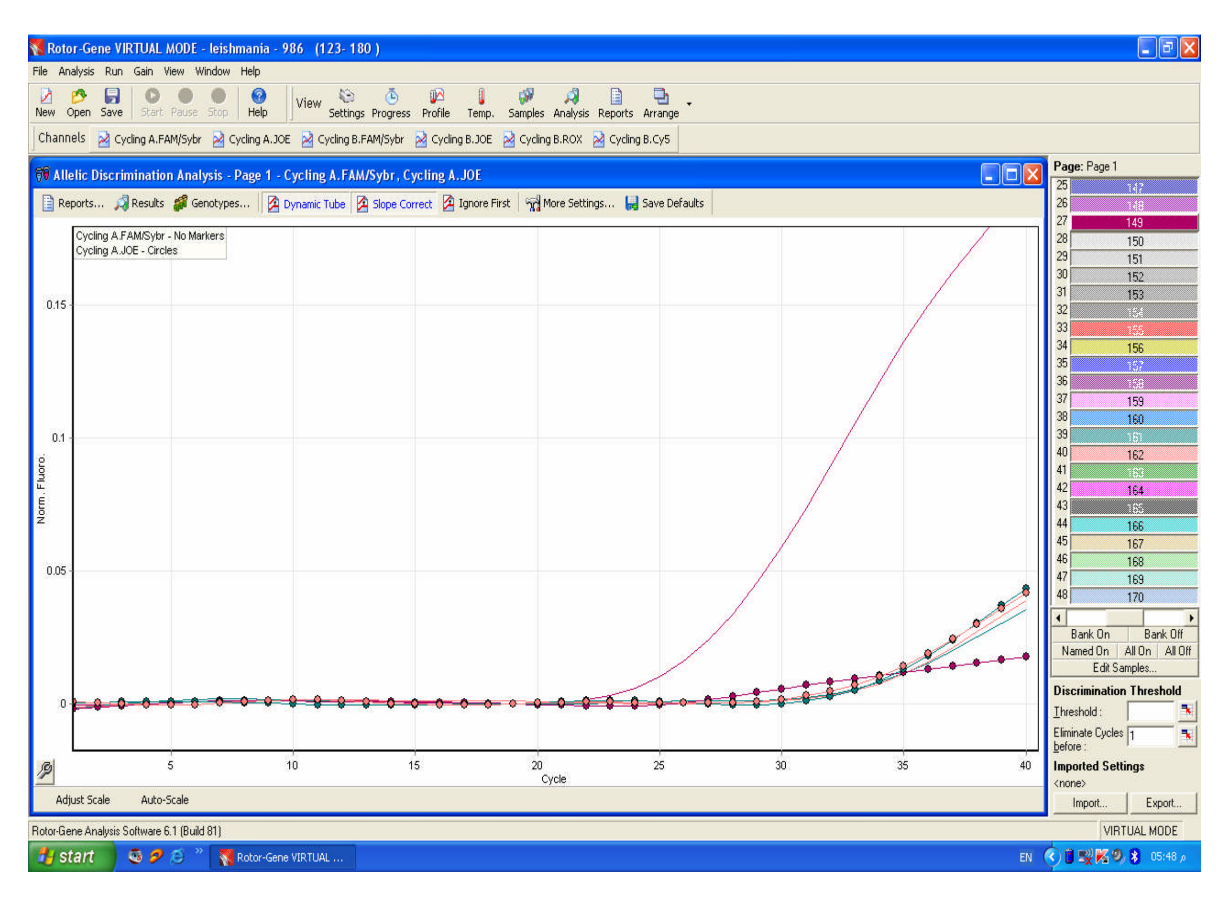
الشكل (71) جهاز الـRotor-Gene 3000 أثناء العمل.

Position		
-986G>A	**primers**	5'-tgatcttgccaaggaagaaggc-3' 5'- ccactaccaccaccgca -3'
	probes	5'-YAK-acctgccgccatcgg- BBQ3 5’ -FAM-acctgctgccatcggga- BBQ3'
-602G>A	**primers**	5'-tccccactcttctctcctttcc-3' 5'-cctggggcagtatgtagagca-3'
	probes	5'-YAK-tcctgttcgtgtgcccc-BBQ3' 5'-FAM-tcctgttcatgtgcccctg-BBQ3'
-4A>G	**primers**	5'- aagatgagaaattggagtctgaggga- 3' 5'-gaaagagagcagcagggtgg-3'
	probes	5'-YAK- ctccatctcctctggtctttgctt - BBQ3' 5'-FAM- agctccatctcttctggtctttgc - BBQ3'

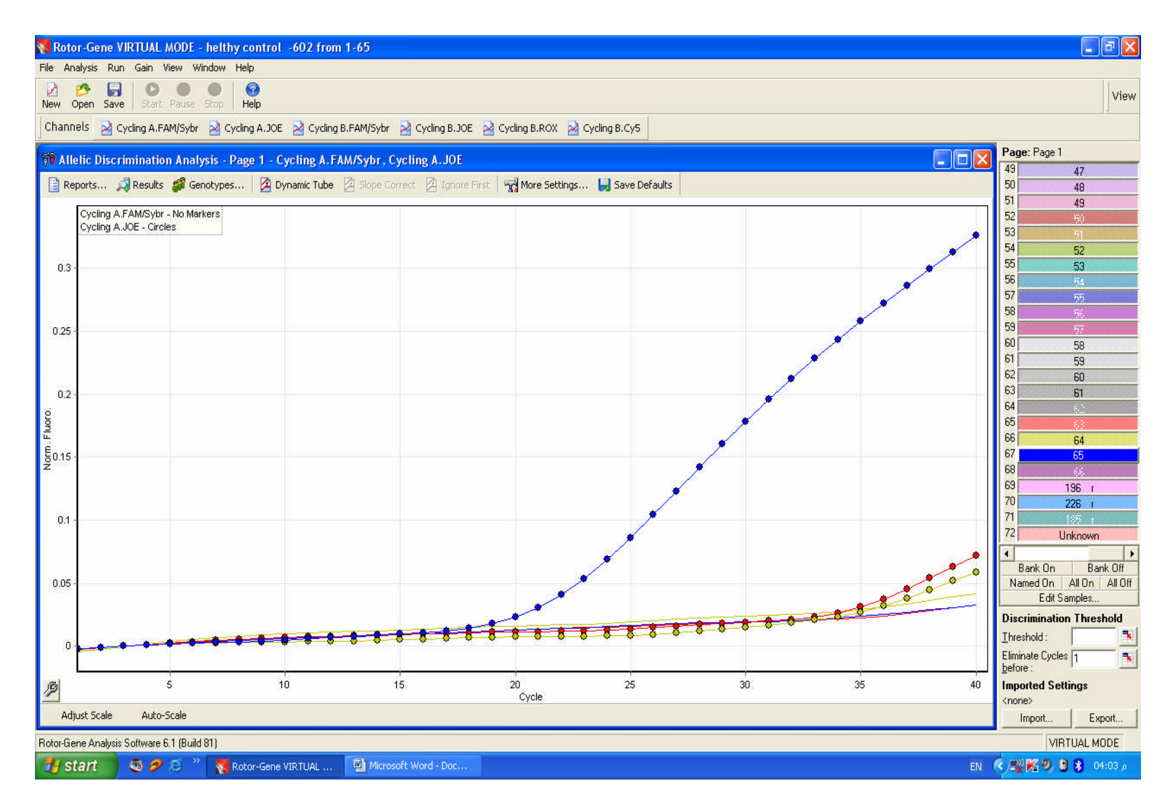
الجدول (12) المشرعات والمسابير المستخدمة لكشف الـSNP في مورثة الفيكولين 2.
YAK(Yakima) وFAM(Fluorescein) هما الصباغان المستخدمان يحمل كل مسبار على النهاية BBQ (BlackBerry Quencher) 3'.

2-4-2-2-2-3- تحديد النمط الجيني: حدد النمط الجيني بطريقتين عيانيا وآليا:

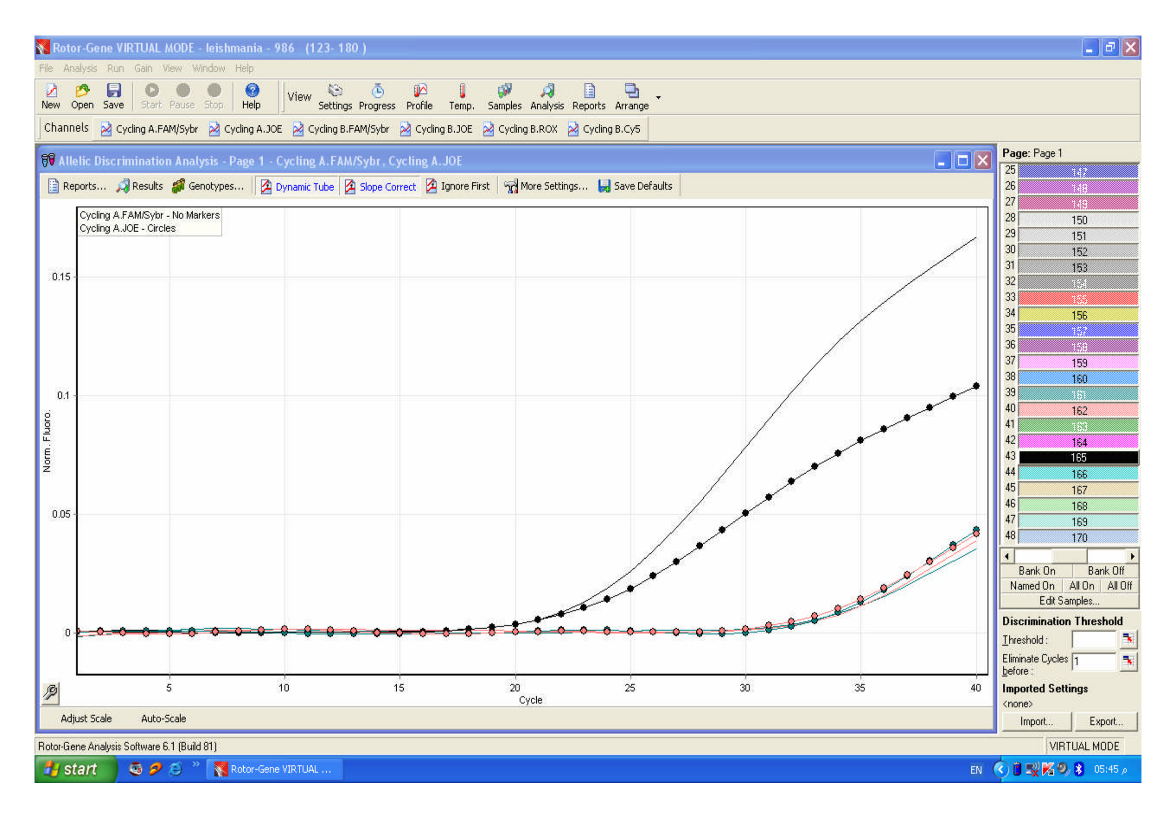
تحديد النمط الجيني عيانيا: وذلك بدراسة المنحنيات إذ يمثل المنحني الأول بدون كرات النتائج من الأليل البري، بينما يمثل المنحني ذو الكرات الصغيرة الطفرة وتفسر النتائج كالتالي: إذا كانت قيمة تألق العينة (التضخيم) عالية في الصبغ الواسم للأليل البري (المنحني بدون كرات) ومنخفض في الصبغ الذي يميز النمط الطافر يعني أن العينة متماثلة اللواقح للنمط البري (الشكل 72)، إذا كانت قيمة التألق في العينة أعلى في الصبغ المميز للنمط الطافر ومنخفضة في الصبغ الواسم للنمط البري يعني أن العينة متماثلة اللواقح للنمط الطافر (الشكل 73)، وفي حال أعطت قيما وسطية لكلا الصبغين تعني متخالفة اللواقح كما في (الشكل 74).



الشكل (72) نتيجة نموذجية للمقايسة إذ يوجد تضخيم بالمنحني بدون كرات أي العينة متماثلة اللواقح للنمط البري.

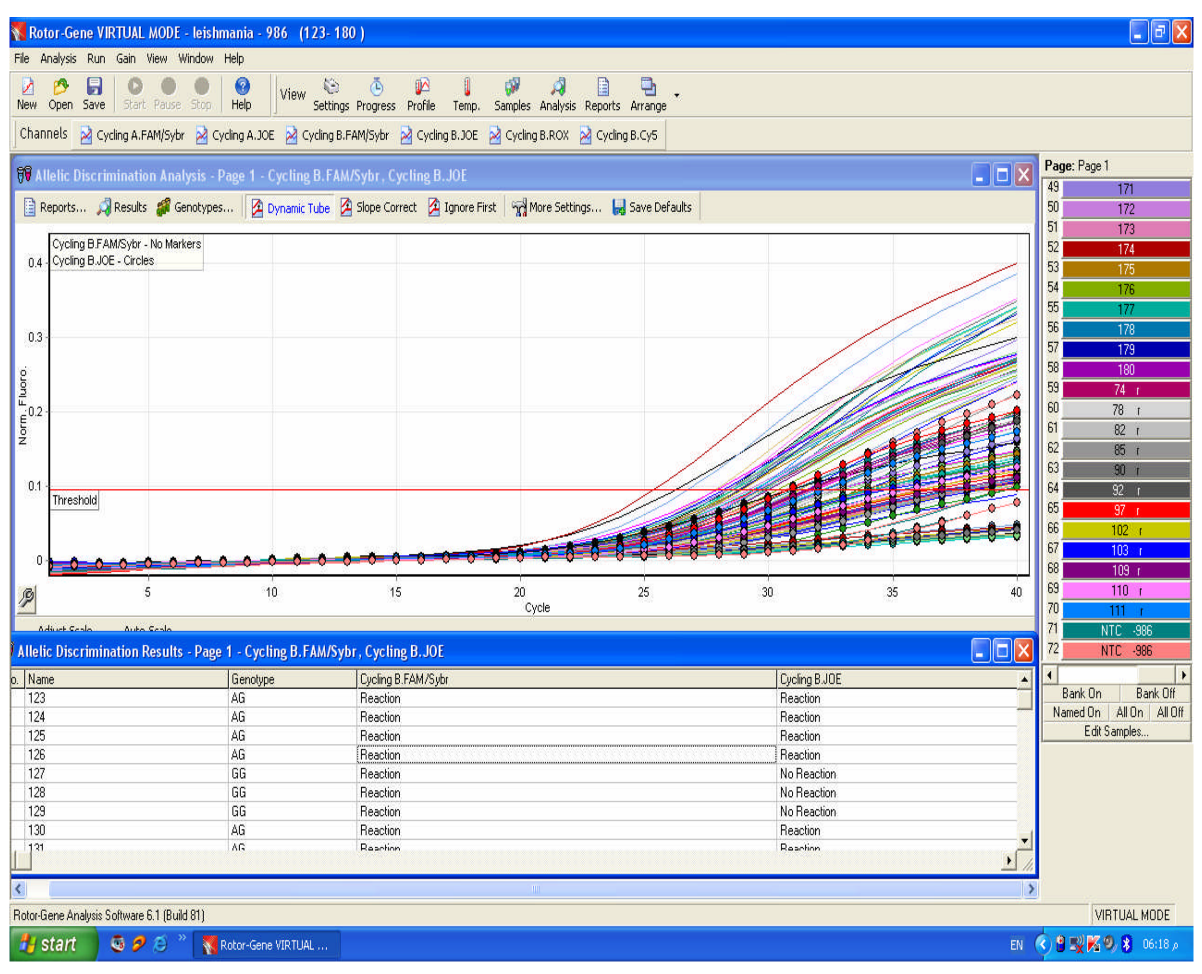


الشكل (73) نتيجة نموذجية للمقايسة إذ يوجد تضخيم بالمنحني ذو الكرات أي العينة متماثلة اللواقح للنمط الطافر.



الشكل (74) نتيجة نموذجية للمقايسة إذ يوجد تضخيم بالمنحنيين بدون ومع كرات أي أن العينة متخالفة اللواقح.

تحديد النمط الجيني آليا: وذلك باستخدام برنامج Rotor-Gene software v 6. 1 (Corbett Life Science, Australia). علـى جهـاز Rotor-Gene 3000 وذلك بتحرير اسم النمط الجيني و تحديد العتبة Threshold وهي الدورة التي يكشف فيها زيادة هامة إحصائيا في التألق، وتحدد العتبة عندما يبدأ النظام بكشف إشارة مرتبطة بالنمو الأسي لـ PCR والتي ترتبط بشكل مباشر بعدد نسخ الدنا القالب في التفاعل، عندها تظهر النتائج في جدول أسفل المنحني (الشكل 75).



الشكل (75) تحديد النمط الجيني آليا حيث تظهر النتائج أسفل المنحني.

2-5- الدراسة الاحصائية Statistical study: درس الارتباط بين المواقع وكذلك احتمالات التأشب باستخدام برنامج الـ Haploview، كما درست تواتر الآلائل والأنماط الفردانية بين المجموعات باستخدام برنامج Arlequin version3 (http://lgb. unige. ch/arlequin) وحسبت كاي مربع و نسب الأرجحية odds ratios واختبار التصحيح لـ فشر Fisher's exact tests باستخدام Stata (Stata Corporation, Texas, USA). واعتبر الفرق ذو مغزى إحصائي في حال كانت P<0.05.

```
          1          2          3          4          5
          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890

   -1,010 aaggcacctc ggcatcccga tggcagcagg tggcagggtg cggtggtggt Promoter
rs3124952
     -960 agtgggaggt gcagtgctgg ttccgtctct gggggcttta ggtatacggc rs3811144
     -910 ctctggggcc ccacctgcta ctgtctctgt ctctaacctg gctcagtcca rs3811143
     -860 aggcgagagt gcaccttcag gccagctctt ctccaaaagg cgaacacaac
     -810 cactgaagta agtccacagc catcctacag gtgggatgtc tggcctcagg
     -760 gctcaggggg ttccctgggc cctaggagtg aaattcacct actctcatcc
     -710 tccctacagg ctaagcccct gcattcacac tcaaggtctc cccttcagat
     -660 gtgtacctgg gtcatagtcc cccaggctcc ccactcttct ctcctttccc
     -610 tcctgttcat gtgcccctgt gctctacata ctgccccagg aaacagtgga
rs3124953 rs3811141
     -560 cacacacgca ttttcctctc cttttcaccc tggcagcctg cctggacctc rs3811140
     -510 atagtggcag tttccaagcc tcctgaggag agtcccaagt ctgctcatga
     -460 tgtggtgagg gttactgtgt aaggcccaca ccagtggccc atgaccagcc
     -410 ctggccatga ggactctagg tattcggata agggagagag acctctttga
     -360 agcagaacat ctttagcaaa cccttccttg ttccccgttc tcagctcatg
     -310 gtgacatctg ctcaccgctg aacaaaggtg ggaggatggg cctgggctct
     -260 ttgcccaagg ccacaagcaa gtcagcctgt tccctggaag gagaccgtcc rs12344051
     -210 ccctgcaggg atgacagtcg ccatgggatc cccaaggggc gggggtagg  rs3811139
     -160 gagcagccct ggagatgatc tcgcacctcc tgctggcgtc accaagcccg
     -110 cggagaggaa gcggctgtca ctcggaagat gagaaattgg agtctgaggg rs7865453
      -60 aggctggctt ctctagccct ataagagggc aggcaccttt tgaagcaaag

      -10 accagaagag ATGGAGCTGG ACAGAGCTGT GGGGGTCCTG GGCGCTGCCA  Exon 1
rs17514136
      +41 CCCTGCTGCT CTCTTTCCTG GGCATGGCCT GGGCTCTCCA GGCGGCAGAC
      +91 ACCTGTCCAG GTAAGGGCAC TCCAGGGCCT CCTCCTGGAA ACTTCTCGTC  Intron 1
rs3128627
     +141 CCTGAAAGCT GGCAGCTTCG TGATTGGTGG CTTCCTGGCT TCCAGGCCTT
     +191 GCACCAGGCC GTGTGGAGCA TCGTCTAACG AGACAGCAGC TCTGCATGCC
     +241 TCATCTTATG TGAACAAACG CAGAGGCCCC GAATGGATGT GGCATCTCAG rs7032741
     +291 AGACGGAGCT TCCTCTGCTT GCCCTCCCAT AATGGAAACC GAGGCAGGTT
     +341 TCCAGTCTCC CTGGGCCACA TGTCCCCCTC TAAGCGTAAA AAGCGTAGTC
     +391 ATGGTGTTGT GTGGGGAGGT GAGGCTTGTG GTGCCAGCTG GGTAGACACC
     +441 AGTCAGATAT TCTGCCATGG TCGCCATCAC AGAGAGACAG GGTGTGAGGT
     +491 GGGGATAAGC ACCCGGAAAG ACAGGGTGTC AGGCGGGGAT GAGCACTGCA
     +541 GGACCTTTCC ATCCAGGACC TGCTGGGCTC TGGAGATGGC AGTTCCCATG
     +591 GTGTCCCTGA TGCGGCACAA TAAGGGTGGC ATTGTCCCCG TGAGTTCTGG
     +641 ACCTCCTTCG GGGCTCCCGA GGGGACACTC GGGTGCCAAA CCATGGGCTC
     +691 CGGCGCATGC GAGGGCAGGT TGAAAATGCA GGTTCTGGAG TCAGGTCCTG
     +741 ACTCCGTCTA CCCGGGGCTG GGATGCAGGG TCAGGAATTT GTGATGCTCC
     +791 TGATGCTTGC AGAGATTCGT GTCAGGATTT CTGGAATGCA TGTGAGACAC rs3124954
     +841 AGAGCTCTGC GGTGTGCTGT GACTAGCATC GCATTCAAGG AGCAATCCGT rs3128626
     +891 GGCGTGAAGT GTGACACAGG CCAGGAACAG CGGGGATTCG CTTGGAAACT
     +941 CCTAGTGGCT CGTTGTGGAG TGGTGGGGTT AGGGTGGCAT TATTTTCTTC rs3128625
     +991 CTTAAATACT TCTAGAGTTT CTAAATGATC AAATAATAGC ACGTGTTATT
   +1,041 TTTGTAACAC ACTCACTTGA ATTTGAGTTA TCTAATTAAA AACAACAAGC
   +1,091 TGCATTCCAG CTCTAGTTTC GCACCAACTT GTTCAGTGTC CTTGAAGGAC rs11103562
   +1,141 GCCTCCCTCT GTGGAGGAAC AAGGTGGACC CACAGGAGCC CATCCACTCT
   +1,191 CAGATCTGCT CCAAGATCAG GCGTGGGAGT TGCAATGGTA GCCTCTCTCC
   +1,241 CTGTGTCCTT CTCACCCGAT ATTGATTACA ATGATATGAT AGATGAGAAC
   +1,291 AGACGAGATT AGGATGCTGT CTTAAATGGT AGGAGCTGAA ATGAACCTGC
   +1,341 ACCCCTCGGT AGGTAAGGGA ACAGAGGCTC AGAGGGGTTA AGGGACTTGT
```

```
+1,391  TTCAGGACAC ACAGTACTGA GGAAGTAAGG TTTGCCTTCA GGCAGGGTAG
+1,441  CCTCCAAGGC CAGGGTTCTG CCCCAAATCA CCTTTCTGCC TGACCAGTGC
+1,491  CCAAGAGGTG AGGACAGACC AAGTGCCCAC CAGGGCAGGA AAACCTCCCT
+1,541  TCCAGGTGAC CCTCCAGCTG AGGGAGGTGG CTGTGGCTAT AGCCATCTGC
+1,591  CCAGTCCTGA TGTCACCAAG ATGGCAGATG CCTTTCAGTT GAGTGGTATA  rs4370608
rs4578023
+1,641  TCTATGGCTC AGTGGAGTCT TCAGGCCCAG GTGACACTGA GTGGCCACCT
+1,691  GTGTTTTTCT GCAGAGGTGA AGATGGTGGG CCTGGAGGGC TCTGACAAGC  Exon 2
+1,741  TCACCATTCT CCGAGGCTGT CCGGGGCTGC CTGGGGCCCC TGGGCCCAAG
+1,791  GGAGAGGCAG GCACCAATGG AAAGAGAGGT AGGTGCAGGC ATGGCTGGGG  Intron 2
+1,841  GCACTGGCTC TTGCTCTTTT TGAAACCAGA TGCTGAGTTG GGCAACACCC  rs3124955
+1,891  CCACCATGGT TCCTAGATCG AGAGCTGGGT CAGGCCCCTG CAAGAGCCAG  rs4370609
rs4509412
+1,941  GAAAAGAACT GACTCCCAGG GCCCAACAGG GTTCTGACAT GGAGGGAGCG  rs4604523
+1,991  TCTTTCTTAG CTATTTCATG AGCTCACATT TGGACATGCT TCTGTAGCTC
+2,041  TGTCTCCTAG TCCTTGATCC AATACCAGCT TTGCTCGGCC GCTGGCACGA
+2,091  CTTCAAGCTC TGTGTCCCTC CACCTTCCCA CCTCAACACG GAGGCCATGA
+2,141  CACTCTTCTC CACCTGTCTC AGATGAGGAA ACTGAGGCTC AGAGAGTCCA  rs12344423
rs3124956
+2,191  GGGATTTCGC TCTGTTCTCA CACTTGGAAG GAAAAGAGCC GAGATTCTAC  rs12340783
+2,241  CCATGGTCTC TGGATTTCCA GCTCCCGGCC CCTGAGTGAA CAGGAGAGCC
+2,291  CCGTGAGGCC TGGGTCCTGG ATCTAGAACC TTCTGGTGCA GGATGGGCAA
+2,341  GCCTGGGCGG GGCCACAGTC ACGTCGTAGC ACGAGCAGGG TCATGGTCAT  rs12340835
+2,391  GATTGGAAAT GACAGCCGCC AGCTCCAGGG TGGGCCCTTT GATCCTGGGC  rs7024491
+2,441  TGGGCAGTTT TCCTCAAGTC AGTGTCTTTG GAAATTGCAG GAGAACGTGG  rs3128624
Exon 3 rs4520243
+2,491  CCCCCCTGGA CCTCCTGGGA AGGCAGGACC ACCTGGGCCC AACGGTAAGG  Intron 3
+2,541  AGGGGACAAG AGTGAGAAGC GGCTTCAAGG CCCTTCCAGA CCTGGCTGCA  rs7037264
+2,591  GAGGAACGTG AGGCGGGTCT TCTGGGGCTG CCACGCTGTC CTCGCCAGAG
+2,641  CCAACGCCTG CCCAGGCAGG GCTCTTGGGG CTTAGTCCAG GGCAGGGGTC
+2,691  TCAGTGTGGG GGAAGGGGTC TCAATGTGTG TGTGGGTTCT CAGTCTGGGG
+2,741  GAGTGGGGTT ATCAGTGTGG GAGCTGGTCT CAATGTGTGT AGGGGGTCTC
+2,791  AGTTTGGGGG AGTGGGGTCA TCAGTGTGGG GGCAGGGTTC TCAATGTCGG
+2,841  AGGAGGGGTT CTTGGTGGTG TAGGGAGAGG TTCTTGGGGT GTGTGTTGGG
+2,891  GGAGGGGTTC CCGGTGGGCA GGCTGTGGGG AGGTGTTATC AGCAGGGAGG  rs12236429
+2,941  GAGGAGCTGT CAATATGGGG GAGAGATTCT GGGATGGGGG AGAGGTTCTG
+2,991  ATTATTCGGG GAGGGACTTT TAGTGTGGGG AGGGGTTCTT AGTGGGGGGG
+3,041  CTGTCTGTAT GGGGGGGTTC TCAGGTAGGG GAAGGTTTTC AGTGCAGGAG
+3,091  CATCTGCCCT GTGGGTGGGC CTGAGACCAA ATCCTGTCCC TCTAATGTGG
+3,141  AAGTGGTCTT GAGAGGGTGG GGGGGGATTG TCTGCCCACC TCTCTAAGCC
+3,191  TCACTCAGTC CTGGCCTCTG TCCCCTGAGC ATGAGGCCCT GTCTTGTCCC
+3,241  CTCCTCCTGA CTCTGCTTGA AAACCAGGAT CAGCCCCGGA TGGCTTGGAG
+3,291  AACCATGCCA ACAAGTTCCA AACACAGAAT TAGTGGAAAT TCTCTGCTTT
+3,341  AAAACAAAGA ATTTTCTGAT ATATTTTCTT GAGGAATAAA TTTTGAGGAA  rs7041446
+3,391  TCGGAGAAAT ACGCAGTAGG AAATTGAAGC TCCCTTTACT CACTCACCTT
+3,441  TACCCACAGA CCTACTCAGA ATAAGACCAC CCTACACTCA CCAAACCCCA  rs3128623
rs11792008
+3,491  GGCTCAGTCA TGGGTTGTGT CTAAACATAA AATACGCAGG TTTGGTGCCC
+3,541  ACACCGCAAA CAACACTCCC CACATCATAT TACTGTGTCC ACCAAGATGG  rs7041633
+3,591  GCTGTTTGCA GGCCTTGGGG CCTCAGGAGA AGCCTGAAGA TCCAGGCTTC
+3,641  CTTTAGTTGG CATGTGGAGG CCTCAGCAGT CTCTGGGATG GTGGCCTCTG
+3,691  CTTCCCCAGG AACCTCTGAA AGGGGTGCAT GTGGTGGAGG GGCCAGTGTA  rs7023162
+3,741  GGCATCCCTC GAGGGAAAGA AAAATTTGGT CAACAGAACC AGGGTCAGGG
+3,791  ACTCCTTGGC TGGACCCATA CCATCACCTC CTGGGGAGGC CCAGAAAATG
+3,841  GTGTCCGCGG ACCAATGGGG GCTGAAGGGC TCTGATTTCC AAACTGTGAC
+3,891  ACGTGTGTCC TCTCTCATCC ATGAACAGGA GCACCTGGGG AGCCCCAGCC  Exon 4
+3,941  GTGCCTGACA GGTGACTGAC CACCCCCACA CTCCTCCCAC GGCTTGTGGC  Intron 4
+3,991  TGCCCTTGGC TGGAAGTCCA GGGTCATACG ACGCCATTGC CAGAATGAAG
+4,041  TGACAAATAT GAACAGAAGA AAATGGTTGC TTGCCCGTTT CCTTGTCCCC  rs12685659
+4,091  TAATTATTCA AGGAAGTGAC AAATATTGTC CAGACAACTT ACATACACTC
+4,141  CATGGCAATT TTTTTCTATT TATAATCTAC GCCAGAAGGC CGGGTGCCCA
```

+4,191 GGAGCTGAAG GTGGGGGTGA CACTGGGAGG TGGGAGGGCC AGGCCAACTG rs12684459
+4,241 GCTGCGGCCA TCACAGCTGC GTGGCCCTGG GGGCCGTGTC CCTGTCCAGG
+4,291 CCTCAGAGTC CCGCTCTGTT CATACAGACG CCTATGGCCC TGCTTCTTCC
+4,341 TCCCAGGCCT CCCTCCTACT GCCTGTGCCC TGCCCAGGGC TCCTGTCCTG
+4,391 CAGCCATTCC CCGGGTTCCC TTCCCAGGCC CGCGTACCTG CAAGGACCTG Exon 5
+4,441 CTAGACCGAG GGCACTTCCT GAGCGGCTGG CACACCATCT ACCTGCCCGA rs17549179
rs12684476
+4,491 CTGCCGGCCC CTGACTGTGC TCTGTGACAT GGACACGGAC GGAGGGGGCT
+4,541 GGACCGTGAG TGTGGGGCTG GGCAGAGGCG GTCAGCCTGG GAGTCCCGGA Intron 5
+4,591 GGCCAGGCTG CACACCTGGT GGGAGAACAC ACTCTGGAAT TCTCTATTCT
+4,641 CCTGGTCGGG GACAGTCAGA GATGATGGGG GAGATGACCG GTGGGTAAAA
+4,691 GTCCAGGCCT TTGGGGGAGG CTGGGAGAGG TTGGGTGCTC TCCTGCTGTG
+4,741 TGGCTTGGGG CTTGTTGCCT CCCCTCTCTG AGCCCCCATT TCCTCCTTCA
+4,791 TCCTGTGGAG TCTGTGAGGA GAACAGGTGG GCGTGCTGGT GACCCCGCCT rs12684512
+4,841 GTGATGCTCT GCCAACTACA AATGCTGCTC CTCTGGAGGG CGGGTCCCCC
+4,891 GTGCTGTGGG ACGTCGGCCT GGCCCCCCCG GCTCCTGTCC CCTGGCTTCT
+4,941 CCACAGGTTT TCCAGCGGAG GGTGGATGGC TCTGTGGACT TCTACCGGGA Exon 6
+4,991 CTGGGCCACG TACAAGCAGG GCTTCGGCAG TCGGCTGGGG GAGTTCTGGC
+5,041 TGGGGAATGA CAACATCCAC GCCCTGACCG CCCAGGGTAG GGCCGCTGCT rs34789496
Intron 6
+5,091 GGGGCTTGGG GGTCGGGGGC CCTGAATGGG GGTGCCCCTG CCTCTTGGGC rs12684723
+5,141 CTGGGCTGCC TGGAACACAA GAGCCTCTTG GCCCACAGGG GATTGGGCCC
+5,191 TGAGCACACT CAGGGTGGCA CTGGGACCTC CGAGGGCTTC GTCCCTGCTG
+5,241 CAGGCTCTGG CAGCATCGGG ACGGGAGAGG GTCAGAGCTC TGGGATGAAG
+5,291 GCCTCTTCAG GTCTTGGCCC CACTGGCATC TCAGGTCCTG AGAGGGGAAG
+5,341 GAGGGACACA GTGGCCCCAT AGTGGAGTTT GGGCCCAACC CCAACTCTGC
+5,391 CTCTAATCCG CTAGGATTTG GGAGTCAAGA GTCTTGCCCT GCTGCTCAGC
+5,441 ACACCCTGCC GGGTCAGAGC TACACAGGCC CCGGGGATGC TGCGGTGCTC
+5,491 TCCGCCCTCT GCCTCCATGG AGTCCAGACC TCCTTCCAGG CCCTGCCCCA
+5,541 GATCCCCAGC TCCCATGTCT AAAGGTAGAG AGCCCTTCCG CTGAGACCCT
+5,591 GAAACCTTTC TCTAACAGGA ACCAGCGAGC TCCGTGTAGA CCTGGTGGAC Exon 7
+5,641 TTTGAGGACA ACTACCAGTT TGCTAAGTAC AGATCATTCA AGGTGGCCGA
+5,691 CGAGGCGGAG AAGTACAATC TGGTCCTGGG GGCCTTCGTG GAGGGCAGTG
+5,741 CGGGTGAGTG TCTGCTTGGG GCTGTGTGGC CTGGGCTTCT GAGGGGGGTT Intron 7
+5,791 TGGGAAGTGG AGAGAGCGTG CTCAGTGTCC TGGTAGCCTT GTGGAAGAGG
+5,841 CCTCACCTCT CTGAGCCAAT TCGTCCATCT CTACATGCAG ACACTAACAT
+5,891 CTGTGCTCTG TGTAGCATGG GGGTCATGGG ACACATCAGT GTATGACTGC
+5,941 AGAAATCCCA GCAAGGGCAT CTGGTAGGAA GGAAGTCTCT GCAGAGCAGG
+5,991 GACCTATGCA CGGTGACAGC AGCTGATATC TCTGCGGGGC ATGGCTGGAA rs11103563
+6,041 GGGGTCTGCC ATGATGGAAT CCAGAGTAGA GAATGATGAT CCTGACCCCT
+6,091 GCCTCCTGTT CTTCTGTGAA ATAAACATAG TACACATTAG GTGGCAGGGC
+6,141 TAGACCTAAA GACAATTTGC CAAGACCACT GCCAACAGCA GGGCAGTATT
+6,191 CACTGGAGTC ATGGATTGCA CTTCTTGGAT TGTGCAGTGC ACAACCTGCC rs10125317
rs7872508
+6,241 TAACCATACA TGGAGGACAC ACCAGGCCAG GCCTCAGGTA TAAAGACTTA
+6,291 TACTGTCTGT AATGATGTTA CTGCCTGTAA CGATGCTCAC ATTTCCTCCT
+6,341 GCACAGGAGA TTCCCTGACG TTCCACAACA ACCAGTCCTT CTCCACCAAA Exon 8
rs17549193
+6,391 GACCAGGACA ATGATCTTAA CACCGGAAAT TGTGCTGTGA TGTTTCAGGG
rs7851696
+6,441 AGCTTGGTGG TACAAAAACT GCCATGTGTC AAACCTGAAT GGTCGCTACC
+6,491 TCAGGGGGAC TCATGGCAGC TTTGCAAATG GCATCAACTG GAAGTCGGGG
+6,541 AAAGGATACA ATTATAGCTA CAAGGTGTCA GAGATGAAGG TGCGACCTGC
+6,591 CTAGcccagg ccggcctcag ggtcaggacg cctccacaca tagttggttg rs4521835
+6,641 gggggtaggg ttgggagctt ggccctacgg tttgtaaaag aaacacatgt
+6,691 cgtgattct

+6,700 aaattgggtt tgtcttgctg tgcggaagag gttcaaatcc agctctgttt
+6,750 ccgcaatcaa ccctttcaga ttgtgacat taactcacct caaacctctg
+6,800 tctttccttg acaatgagta agaatgtgtt cctgaccatg ccagcaggaa

```
+6,850  ccttccttaa ggacaaatac aagactttga agctgcgatg ggctcagagt
+6,900  gcagccctgc tcaggtccct gggcaggcta aacgccttcc tggggctcga
+6,950  ccatctgggc ttctctgtga gctggatggc agggaagtca gaaggcacat
+7,000  tggagaggaa gtttctcttg cactcagaga tgccgttgcc tgtccaaggc
+7,050  ccccagcctc gtagccgcag ctctgctcac tctcccccgt cacccaggct  rs12115600
+7,100  tcctgccgcc tgctgtcctg ggtattcgtg ggatctgctc gctacttcct
+7,150  cacaagccga agcaagagtg gcagtgtgcc tgtgactccc tcatcaaaac  rs7045822
+7,200  ggagagagtg gttacatgag gcaggtgtga gggacccgag cactcctgag  rs11103564
rs7045964
+7,250  gagggaagaa cactcctctt ggccatgagt gtccatccca aagctgccct
+7,300  gcagcctagc ccagtgcaga ttgaatcaga aagccaaagc cccttccacc
+7,350  cgcttctctc aggcaagctg cctgcaagag agaaaagtgt attagtgcag
+7,400  gagcttgtgt ctgctgagga tggcacctgg ccctctcctc tcaccacgtc  rs11103565
+7,450  cgggtcctcc tgaggaccgg tcccctgtcc ccggtcccca gccagctcag
+7,500  cctgaccagg cttttagagg ctccgcaccc cagcatcggc cagtgctgac
+7,550  ccttgtacgg ctgtttgggt ccccgatcac tctcataaca gccctgccct  rs7040372
+7,600  tgtcctatac cctctactca gagaggatcc agaagggtcc aaggaggcca  rs7046516
+7,650  tgatccctcc ctgagctttt tcacgcgggc cccctccttc ccctacgagg
```

الشكل (76) تسلسل الأسس الأزوتية في مورثة الفيكولين 2 وأهم الـ SNP الموجودة فيها، تعتبر الـ SNP الملونة باللون الأحمر وظيفية.

```
  1 ATG GAG CTG GAC AGA GCT GTG GGG GTC CTG GGC GCT GCC ACC CTG CTG
rs61736807 rs72551122 rs55797213
  1 Met Glu Leu Asp Arg Ala Val Gly Val Leu Gly Ala Ala Thr Leu Leu
                Val
 49 CTC TCT TTC CTG GGC ATG GCC TGG GCT CTC CAG GCG GCA GAC ACC TGT
 17 Leu Ser Phe Leu Gly Met Ala Trp Ala Leu Gln Ala Ala Asp Thr Cys

 97 CCA GAG GTG AAG ATG GTG GGC CTG GAG GGC TCT GAC AAG CTC ACC ATT
 33 Pro Glu Val Lys Met Val Gly Leu Glu Gly Ser Asp Lys Leu Thr Ile

145 CTC CGA GGC TGT CCG GGG CTG CCT GGG GCC CCT GGG CCC AAG GGA GAG
rs55865317
 49 Leu Arg Gly Cys Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
193 GCA GGC ACC AAT GGA AAG AGA GGA GAA CGT GGC CCC CCT GGA CCT CCT
rs4520243
 65 Ala Gly Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro
241 GGG AAG GCA GGA CCA CCT GGG CCC AAC GGA GCA CCT GGG GAG CCC CAG

 81 Gly Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Ala Pro Gly Glu Pro Gln
289 CCG TGC CTG ACA GGC CCG CGT ACC TGC AAG GAC CTG CTA GAC CGA GGG
rs55895215
 97 Pro Cys Leu Thr Gly Pro Arg Thr Cys Lys Asp Leu Leu Asp Arg Gly
                        Cys
337 CAC TTC CTG AGC GGC TGG CAC ACC ATC TAC CTG CCC GAC TGC CGG CCC
rs17549179 rs12684476
113 His Phe Leu Ser Gly Trp His Thr Ile Tyr Leu Pro Asp Cys Arg Pro
    Tyr             Ser
385 CTG ACT GTG CTC TGT GAC ATG GAC ACG GAC GGA GGG GGC TGG ACC GTT
129 Leu Thr Val Leu Cys Asp Met Asp Thr Asp Gly Gly Gly Trp Thr Val

433 TTC CAG CGG AGG GTG GAT GGC TCT GTG GAC TTC TAC CGG GAC TGG GCC
rs56235352 rs56281005
145 Phe Gln Arg Arg Val Asp Gly Ser Val Asp Phe Tyr Arg Asp Trp Ala
            Gln                                 Gln
481 ACG TAC AAG CAG GGC TTC GGC AGT CGG CTG GGG GAG TTC TGG CTG GGG
161 Thr Tyr Lys Gln Gly Phe Gly Ser Arg Leu Gly Glu Phe Trp Leu Gly
```

```
   529 AAT GAC AAC ATC CAC GCC CTG ACC GCC CAG GGA ACC AGC GAG CTC CGT
rs34789496 rs55860122
   177 Asn Asp Asn Ile His Ala Leu Thr Ala Gln Gly Thr Ser Glu Leu Arg
                                        Thr
   577 GTA GAC CTG GTG GAC TTT GAG GAC AAC TAC CAG TTT GCT AAG TAC AGA
   193 Val Asp Leu Val Asp Phe Glu Asp Asn Tyr Gln Phe Ala Lys Tyr Arg

   625 TCA TTC AAG GTG GCC GAC GAG GCG GAG AAG TAC AAT CTG GTC CTG GGG
   209 Ser Phe Lys Val Ala Asp Glu Ala Glu Lys Tyr Asn Leu Val Leu Gly

   673 GCC TTC GTG GAG GGC AGT GCG GGA GAT TCC CTG ACG TTC CAC AAC AAC
rs17549193
   225 Ala Phe Val Glu Gly Ser Ala Gly Asp Ser Leu Thr Phe His Asn Asn
                                                Met
   721 CAG TCC TTC TCC ACC AAA GAC CAG GAC AAT GAT CTT AAC ACC GGA AAT
   241 Gln Ser Phe Ser Thr Lys Asp Gln Asp Asn Asp Leu Asn Thr Gly Asn

   769 TGT GCT GTG ATG TTT CAG GGA GCT TGG TGG TAC AAA AAC TGC CAT GTG
rs7851696 rs55874707
   257 Cys Ala Val Met Phe Gln Gly Ala Trp Trp Tyr Lys Asn Cys His Val
           Ser
   817 TCA AAC CTG AAT GGT CGC TAC CTC AGG GGG ACT CAT GGC AGC TTT GCA
   273 Ser Asn Leu Asn Gly Arg Tyr Leu Arg Gly Thr His Gly Ser Phe Ala

   865 AAT GGC ATC AAC TGG AAG TCG GGG AAA GGA TAC AAT TAT AGC TAC AAG
   289 Asn Gly Ile Asn Trp Lys Ser Gly Lys Gly Tyr Asn Tyr Ser Tyr Lys

   913 GTG TCA GAG ATG AAG GTG CGA CCT GCC TAG
   305 Val Ser Glu Met Lys Val Arg Pro Ala ???
```

الشكل (77) تسلسل الحموض الأمينية في بروتين الفيكولين 2 وأهم التغيرات فيها.

6-2- النتائج Results:

6-2-1- الـ SNP الجديدة في جينة الفيكولين 2 عند 40 عينة من الشواهد: وجدنا 9 أماكن تبدل نوكليوتيدي وحيد (SNPs) جديدة وذلك في عينات الشواهد الأربعين التي تمت دراسة كامل المورثة فيها، وقع اثنين من هذه الـSNPs في منطقة المعزاز (‎-418G>A،-722C>T) وواحد في الانترون2 (‎+1898G>C)، وأربعة في الانترون الخامس(‎+4577C>G،+4647C>T،4704G>C،+4806G>A)، وواحد في الاكزون السادس (‎+4986C>T) والذي يؤدي إلى تغيير الحمض الأميني 157 من أرجنين Arg إلى تريبتوفان Trp، والتعدد الشكلي الأخير وقع في الاكزون الثامن (‎+6584G>A) مؤديا إلى تغيير الحمض الأميني في الموقع 311 من أرجنين إلى غليسين، معظم هذه التغيرات وجدت بتواتر منخفض ماعدا الـ SNP في الموقع 4704+ حيث بلغ تواتر الأليل الأصغر فيه 0.14 والجدول التالي يظهر التعددات الشكلية في المورثة وتواتر الآلائل فيها:

موقع الأساس	رقم تنصيب الـSNP	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	تواتر الأليل الأكبر	تواتر الأليل الأصغر
-986	rs3124952	G	A	0.50	0.50
-722	rs76739162	C	T	0.99	0.01
-602	rs3124953	G	A	0.71	0.29
-557	rs3811140	A	G	0.89	0.11
-418	rs74693003	G	A	0.99	0.01
-214	rs12344051	G	A	0.97	0.03
-64	rs28969369	A	C	0.86	0.14
-4	rs17514136	A	G	0.80	0.20
1878	rs3124955	T	C	0.62	0.38
1898	rs75577478	G	C	0.97	0.03
2051	rs73565973	T	C	0.90	0.10
2088	rs73565979	C	T	0.90	0.10
2182	rs12344423	G	A	0.51	0.49
2417	rs7024491	A	G	0.66	0.34
2472	rs3128624	A	G	0.63	0.37
2488	rs4520243	T	C	0.62	0.38
2545	rs7037264	G	A	0.63	0.37

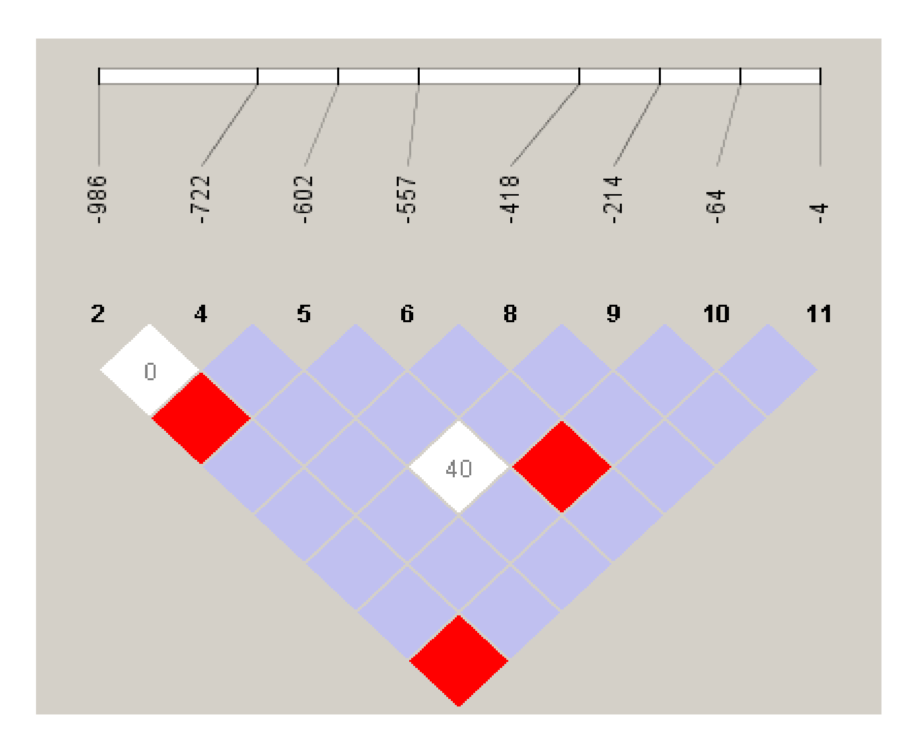
موقع الأساس	رقم تنصيب الـSNP	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	تواتر الأليل الأكبر	تواتر الأليل الأصغر
4577	rs76665625	C	G	0.99	0.01
4647	rs75123259	C	T	0.99	0.01
4704	rs56117058	G	C	0.86	0.14
4806	rs77254375	G	A	0.99	0.01
4888	rs56200327	C	T	0.99	0.01
4986	rs56281005	C	T	0.99	0.01
6031	rs11103563	A	G	0.97	0.03
6183	rs62573178	G	A	0.92	0.08
6220	rs7872508	T	G	0.97	0.03
6359	rs17549193	C	T	0.81	0.19
6424	rs7851696	G	T	0.95	0.05
6584	rs76267164	G	A	0.99	0.01

الجدول (13) الـSNPs في جينة الفيكولين 2 الموجودة في 40 عينة من عينات الشواهد.

يشير اللون القاتم للـ SNPs الجديدة، الترقيم حسب تسلسل الجين في الموقع (http://snpper.chip. org).

2-6-2-دراسة LD للـ SNP الموجودة في منطقة المعزاز من جينة الفيكولين 2:

2-6-2-1-دراسة معامل LD (LD coefficient=D') وLOD: قمنا باستخدام البرنامج الحاسوبي المدعو الـ Haploview بدراسة معامل اختلال التوازن الارتباطي D' ولغاريتم نسبة الأرجحية LOD بين كل موقعين، إذ يقوم البرنامج بالتعبير عن النتائج كالتالي: عندما تكون (D'=1 وLOD≥2) بين موقعين تظهر مربعات بلون أحمر مما يعني درجة عالية من الارتباط، بينما تشير المربعات الزرقاء إلى (D'=1 وLOD<2) وبالتالي درجة أقل من الارتباط، أما المربعات البيضاء فتشير إلى (LOD<2 وD'<1) أي درجة منخفضة جدا من الارتباط (الشكل 78).



الشكل (78) مخطط الـ Haploview يظهر دراسة (LD) لمنطقة المعزاز من مورثة الـ FCN2 عند40 عينة من الأصحاء و تشير الأرقام داخل المربعات إلى قيمة'D معبرا عنها بشكل نسبة مئوية.

نستنتج من الشكل السابق وجود توليفة أليلية قوية strong allelic combinations بين كل زوج من المواقع التالية: (557- و64-)، (602- و986-)، (4- و986-) وهذا ما يؤكده الجدول التالي :

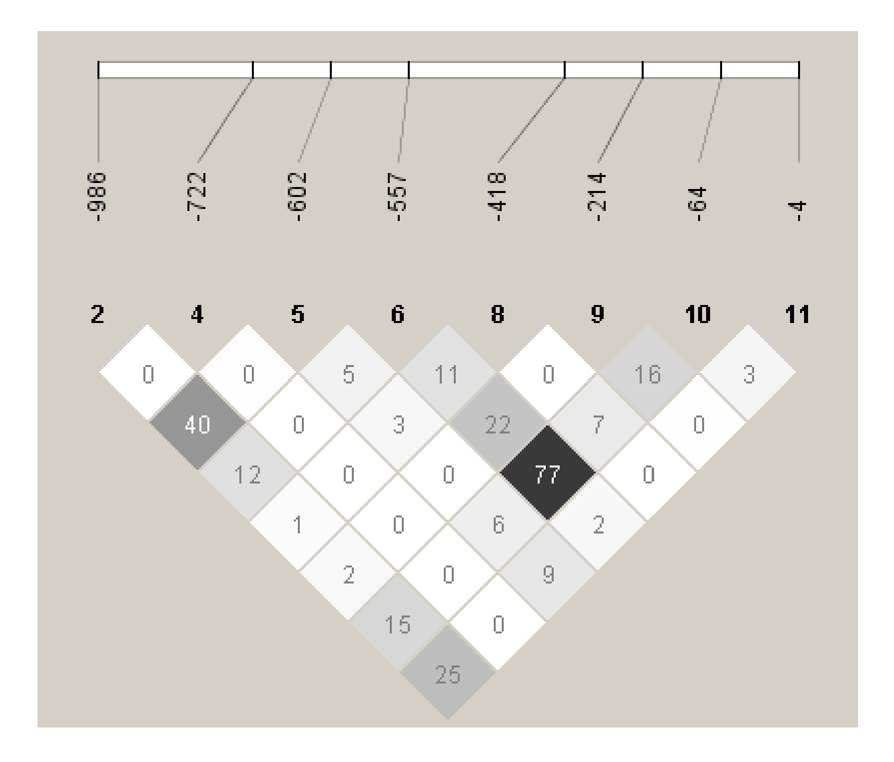
الموقع الأول	الموقع الثاني	D'	LOD	r^2
-986	-722	0	0	0
-986	**-602**	**1**	**5.99**	**0.4**
-986	-557	1	1.11	0.12
-986	-418	1	0.01	0.01
-986	-214	1	0.29	0.03
-986	-64	1	1.76	0.16
-986	**-4**	**1**	**2.8**	**0.25**
-722	-602	1	0.15	0.01
-722	-557	1	0.05	0
-722	-418	1	0.01	0
-722	-214	1	0.01	0

الموقع الأول	الموقع الثاني	D'	LOD	r^2
-722	-64	1	0.07	0
-722	-4	1	0.09	0
-602	-557	1	0.41	0.05
-602	-418	1	0.26	0.03
-602	-214	0.4	0.01	0
-602	-64	1	0.83	0.06
-602	-4	1	1.85	0.09
-557	-418	1	0.68	0.11
-557	-214	1	1.41	0.23
-557	**-64**	**1**	**6.33**	**0.78**
-557	-4	1	0.14	0.03
-418	-214	1	0.01	0
-418	-64	1	0.57	0.08
-418	-4	1	0.09	0
-214	-64	1	1.17	0.16
-214	-4	1	0.19	0.01
-64	-4	1	0.21	0.04

الجدول (14) درجات الارتباط بين المواقع المدروسة في منطقة المعزاز في 40 عينة من الشواهد.

2-6-2-2- دراسة معامل الارتباط correlation coefficient r^2 بين المواقع المدروسة:

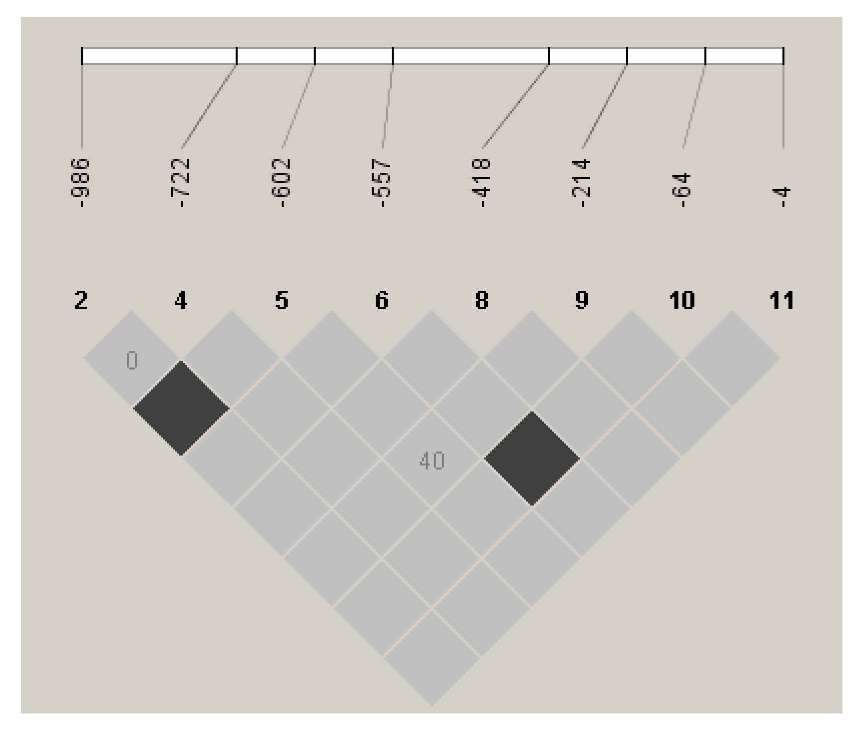
أيضا وبالاعتماد على برنامج الـ Haploview حسبت معاملات الارتباط وحولت إلى مخطط تتلون فيه المربعات باللون الأبيض عندما تكون $r^2=0$ وبالأسود عندما تكون $r^2=1$ وتتناسب شدة اللون الرمادي طردا مع قيم r^2 والنتائج موضحة في الشكل التالي:



الشكل (79) مخطط الـ Haploview يظهر قيمة معامل الارتباط r^2 بين المواقع المدروسة معبرا عنها بشكل نسبة مئوية وبتدريجات اللون من الأبيض إلى الرمادي فالأسود.

من الواضح من الشكل السابق أن معامل الارتباط القوي وجد بين الموقعين (557- و64-) حيث r^2=0.77 تلاه (602- و986-) r^2=0.4 و أخير الموقع (4- و986-) حيث r^2=0.25 أما القيم الأخرى فتراوحت بين 0 و 0.22 .

3-2-6-2- دراسة موثوقية الارتباط Confidence Bounds بين المواقع: درسنا في هذه الفقرة عبر برنامج الـ haploview أيضا موثوقية الارتباط بين المواقع حيث تمثل المربعات الملونة باللون الرمادي الغامق أو الأسود في المخطط الناتج دليلا قويا على وجود LD بينما يصعب تفسير اللون الرمادي الفاتح أما اللون الأبيض فيشير إلى احتمال التأشب.



الشكل (80) مخطط الـ Haploview يوضح موثوقية الارتباط بين المواقع المدروسة في منطقة المعزاز.

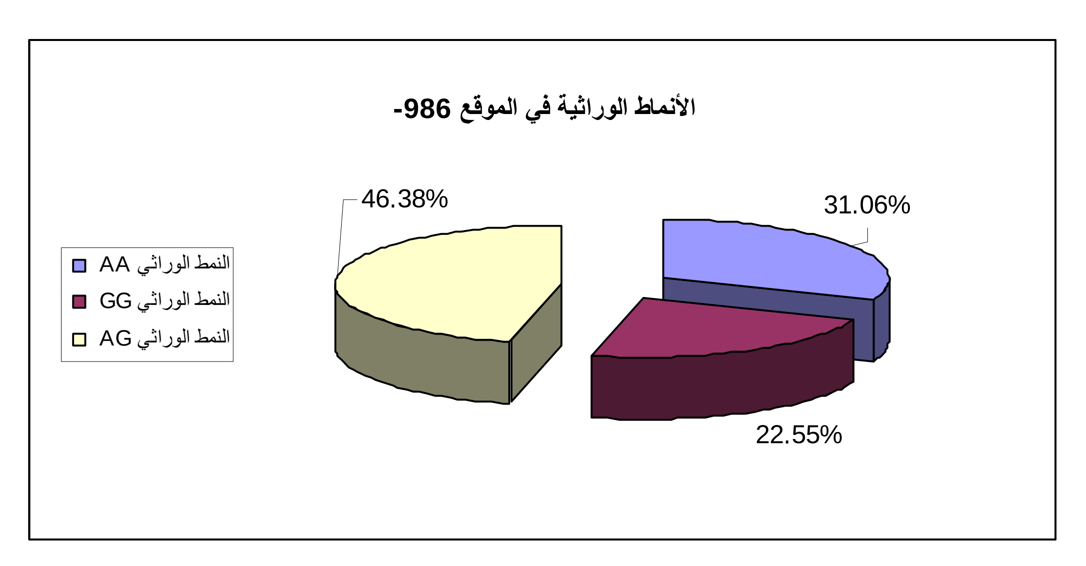
نلاحظ من الشكل أن الارتباطات الموثوقة وجدت بين الموقعين (557-،64-) وكذلك الحال (986-،602-) ولا يوجد احتمال للتأشب بين أي من المواقع المدروسة.

2-6-3-دراسة تواتر الأنماط الوراثية و الآلائل للمواقع الوظيفية الأربعة (6424+،4-،602-،986-) من مورثة الفيكولين 2 في مجموعة المرضى:

2-6-3-1-الموقع 986- (rs3124952): الذي يضم الأليلين GوA ولقد توزعت الأنماط الوراثية كما في الجدول التالي:

النمط الوراثي للموقع 986-	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي AA	73	31.06%
النمط الوراثي GG	53	22.55%
النمط الوراثي AG	109	46.38%
المجموع	235	100.00%

الجدول (15) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 986- في مجموعة المرضى.

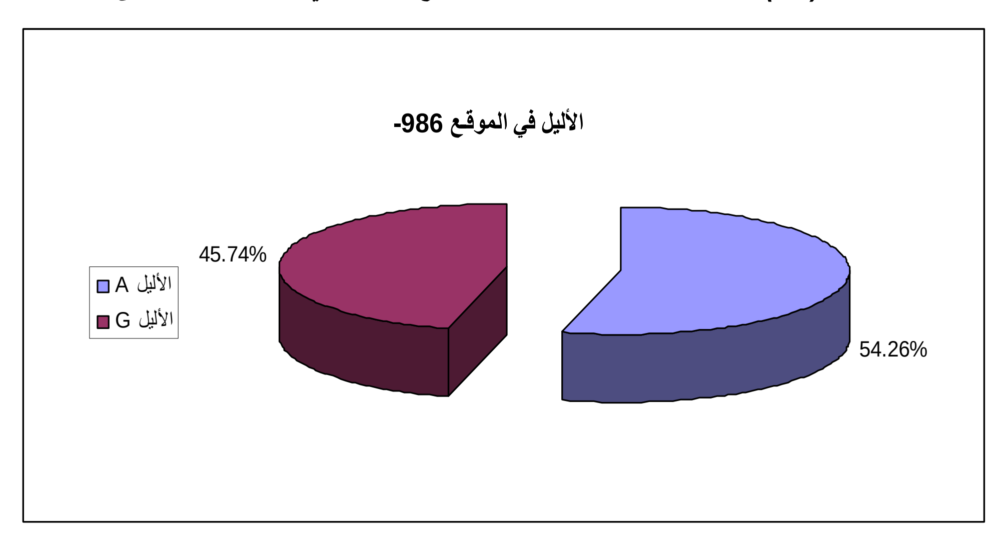


الشكل (81) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 986- في مجموعة المرضى.

نلاحظ من الجدول والشكل السابقين غلبة النمط الوراثي المتخالف اللواقح AGعلى بقية الأنماط. أما الآلائل فقد توزعت على النحو التالي :

النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع 986-
54.26%	255	الأليل A
45.74%	215	الأليل G
100.00%	470	المجموع

الجدول (16) عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 986- في مجموعة المرضى.



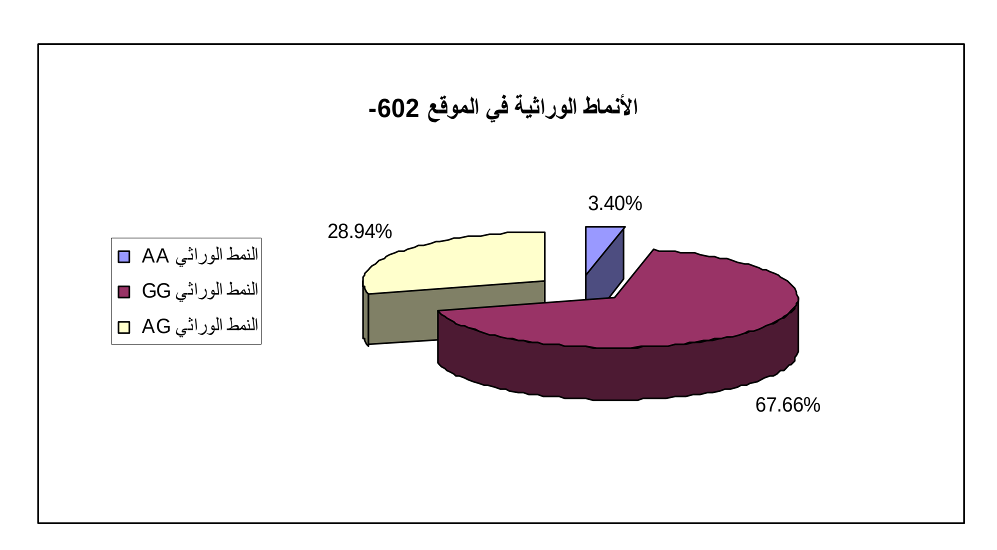
الشكل (82) توزع الأليلين A,G للموقع 986- في مجموعة المرضى.

يبدو من الجدول والشكل السابقين غلبة الأليل A على الأليل G أي أن الأليل الأكبر أو الرئيسي في الموقع 986-هو الأليل A، بينما الأليل الأصغر هو G.

2-6-3-2-الموقـع 602- (rs3124953): الـذي يـضم الأليلـين A,G ولقـد توزعـت الأنمـاط الوراثية كما يلي:

النسبة المئوية	العدد	النمط الوراثي للموقع -602
3.40%	8	النمط الوراثي AA
67.66%	159	النمط الوراثي GG
28.94%	68	النمط الوراثي AG
100.00%	235	المجموع

الجدول (17) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 602- في مجموعة المرضى.

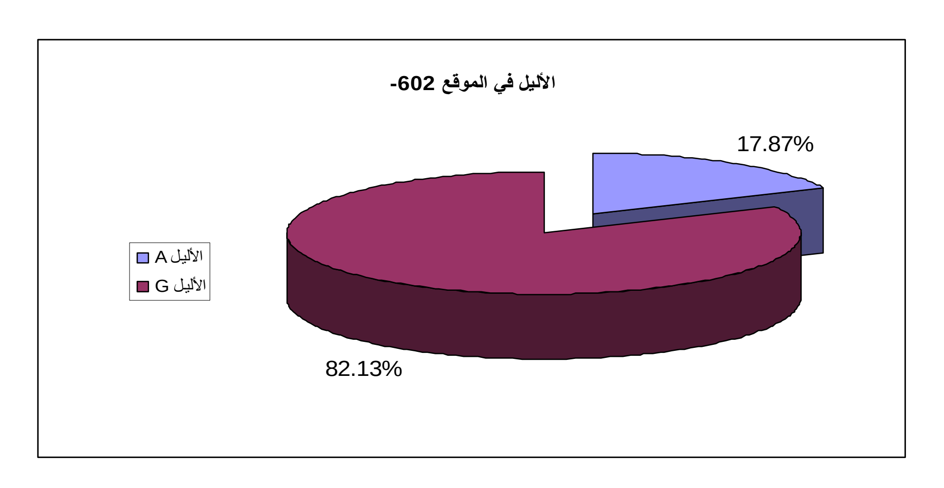


الشكل (83) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 602- في مجموعة المرضى.

أما الآلائل في الموقع 602- فقد توزعت بالشكل التالي:

النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع -602
17.87%	84	الأليل A
82.13%	386	الأليل G
100.00%	470	المجموع

الجدول (18) يبين عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 602- في مجموعة المرضى.



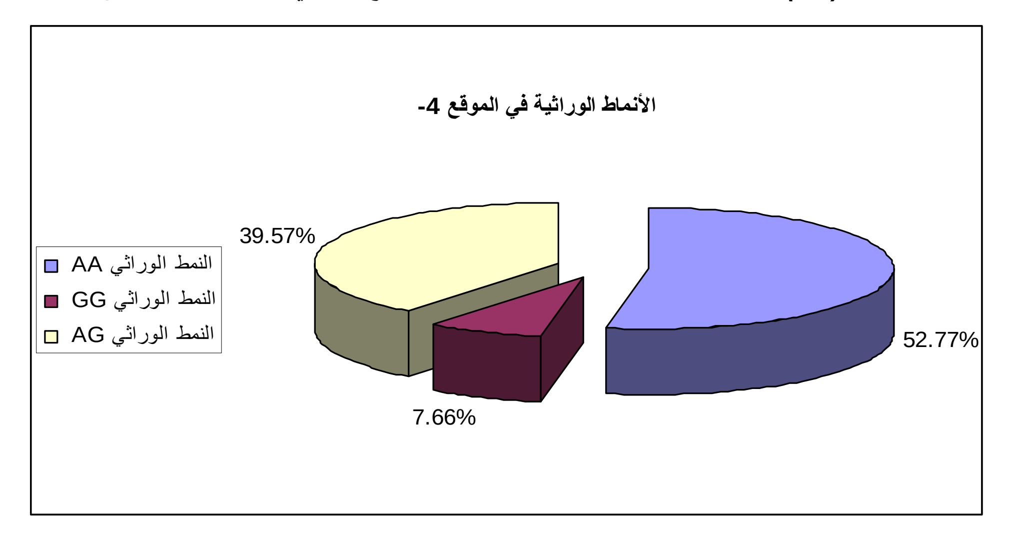
الشكل (84) توزع الأليلين A,G للموقع 602- في مجموعة المرضى.

نستنتج مما سبق غلبة النمط الوراثي GG وبذلك يكون الأليل G هو الأليل الرئيسي أما الأليل A فهو الأليل الأصغر في الموقع 602- عند مجموعة المرضى (الشكل 84).

2-6-3-3-الموقع 4-(rs17514136): الذي يضم أيضا الأليلين A,G ولقد توزعت الأنماط الوراثية كما يلي:

النمط الوراثي للموقع 4-	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي AA	124	52.77%
النمط الوراثي GG	18	7.66%
النمط الوراثي AG	93	39.57%
المجموع	235	100.00%

الجدول (19) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 4- في مجموعة المرضى.

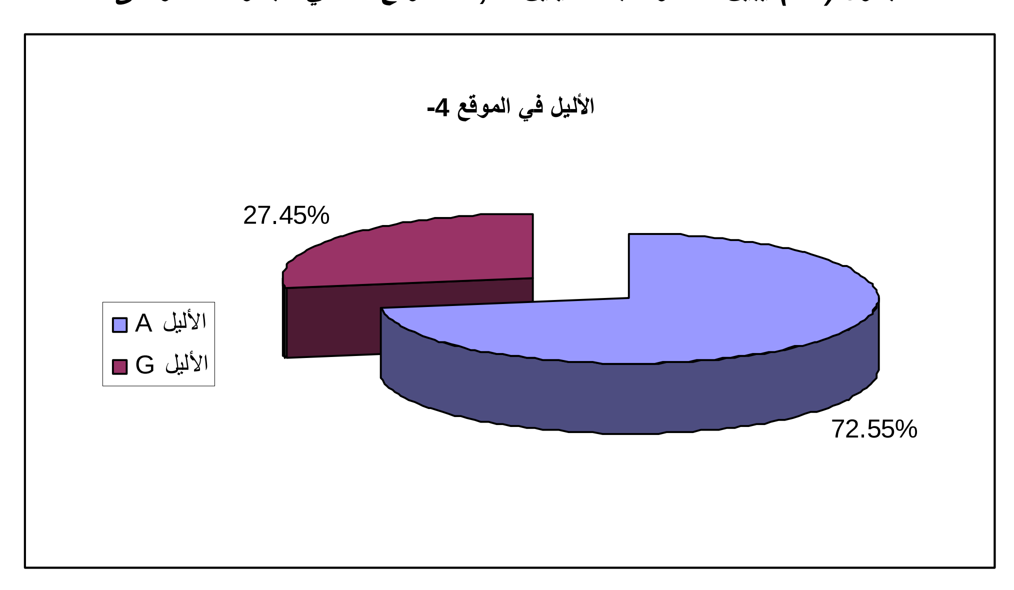


الشكل (85) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 4- في مجموعة المرضى.

أما توزع الآلائل في هذا الموقع فكان على النحو التالي:

الأليل في الموقع -4	العدد	النسبة المئوية
الأليل A	341	72.55%
الأليل G	129	27.45%
المجموع	470	100.00%

الجدول (20) يبين عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 4- في مجموعة المرضى.



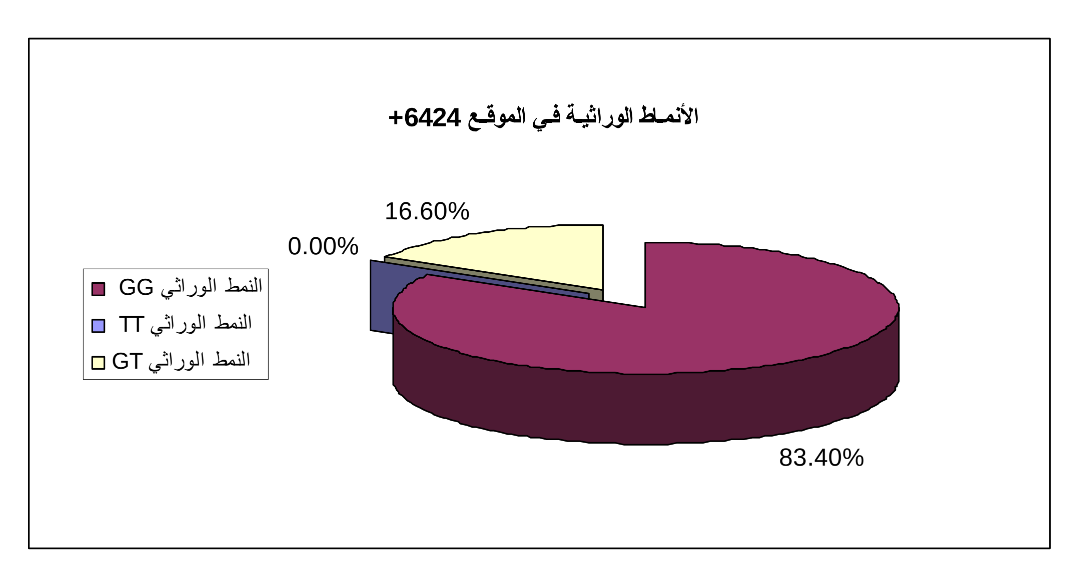
الشكل (86) توزع الأليلين A,G للموقع 4- في مجموعة المرضى.

نستنتج مما سبق غلبة النمط الوراثي AA إذ شكل الأليل A الأليل الأكبر بينما الأليل G هو الأليل الأصغر في الموقع 4- عند مجموعة المرضى (الشكل86،85).

2-6-3-4-الموقع 6424+ (rs7851696): الذي يضم الأليلين G,T توزعت الأنماط الوراثية كما يلي:

النمط الوراثي للموقع +6424	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي GG	196	83.40%
النمط الوراثي TT	0	0.00%
النمط الوراثي GT	39	16.60%
المجموع	235	100.00%

الجدول (21) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 6424+ في مجموعة المرضى .

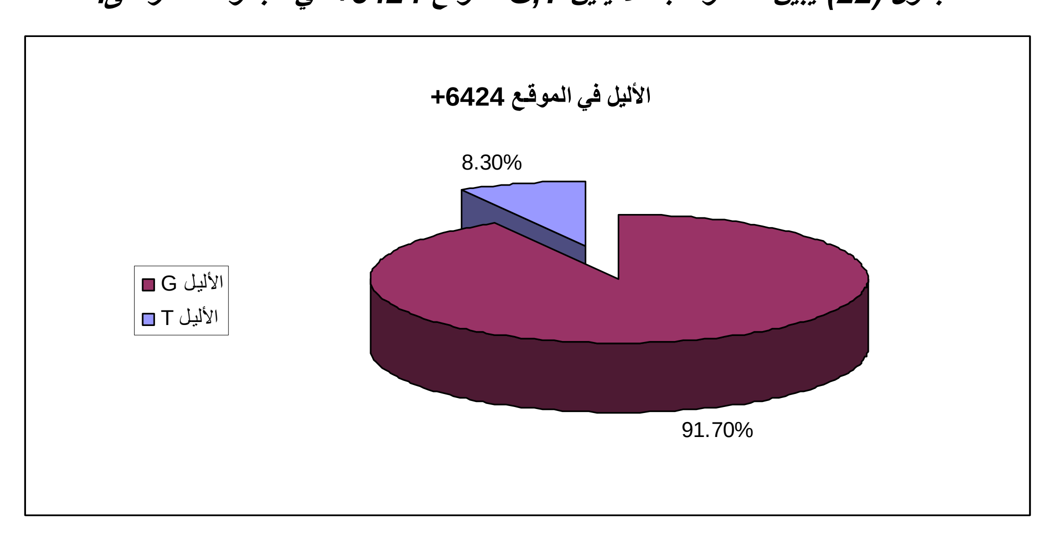


الشكل (87) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 6424+ في مجموعة المرضى.

أما توزع الآلائل في هذا الموقع فهو على النحو التالي:

الأليل في الموقع 6424+	العدد	النسبة المئوية
الأليل G	431	91.70%
الأليل T	39	8.30%
المجموع	470	100.00%

الجدول (22) يبين عدد ونسبة الأليلين G,T للموقع 6424+ في مجموعة المرضى.

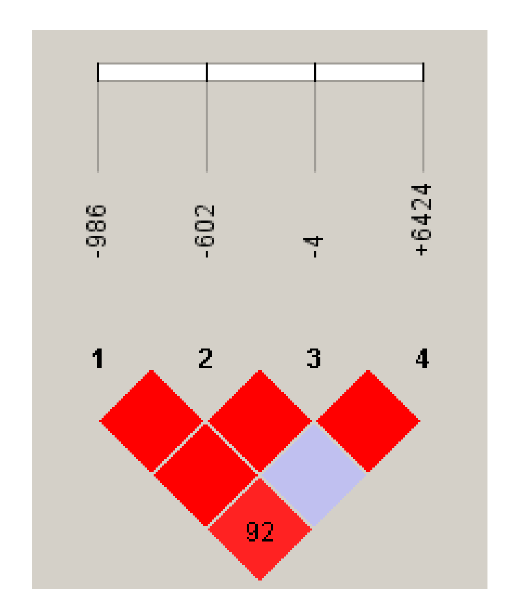


الشكل (88) توزع الأليلين T,G للموقع 6424+ في مجموعة المرضى.

إذا بدراسة توزع الأنماط الوراثية والآلائل في الموقع 6424+ يتبين غلبة النمط الوراثي GG بينما انعدم وجود النمط الوراثي TT (الشكل87)، وبذلك يكون الأليل G الأليل الرئيسي بينما يشكل الأليل A الأليل الأصغر في هذا الموقع عند مجموعة المرضى (الشكل 88).

2-6-4-دراسة LD للمواقع الوظيفية الأربعة (+6424،-4،-602،-986) من مورثة الفيكولين 2 في مجموعة المرضى:.

2-6-4-1-دراسة معامل الـLD (LD coefficient=D') D' وLOD: والنتائج في الشكل التالي:



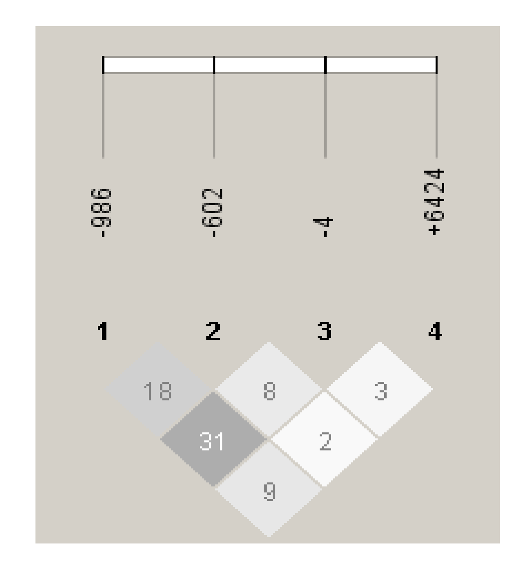
الشكل (89) يفسر LD بين المواقع الأربعة باستخدام برنامج Haploview وتشير الأرقام داخل المربعات إلى قيم D' معبرا عنها بشكل نسبة مئوية.

نلاحظ من الشكل السابق أن الارتباط كان قويا بين كل المواقع ما عدا (-602،+6424) (المربع الأزرق) وهذا ما يوضحه أيضا الجدول التالي:

r^2	LOD	D'	الموقع 2	الموقع 1
0.18	12.99	1	-602	-986
0.32	26.34	1	-4	-986
0.09	5.87	0.92	6424	-986
0.08	7.73	1	-4	-602
0.02	1.09	1	6424	-602
0.03	2.41	1	6424	-4

الجدول (23) درجات الارتباط بين المواقع الأربعة المدروسة في مجموعة المرضى.

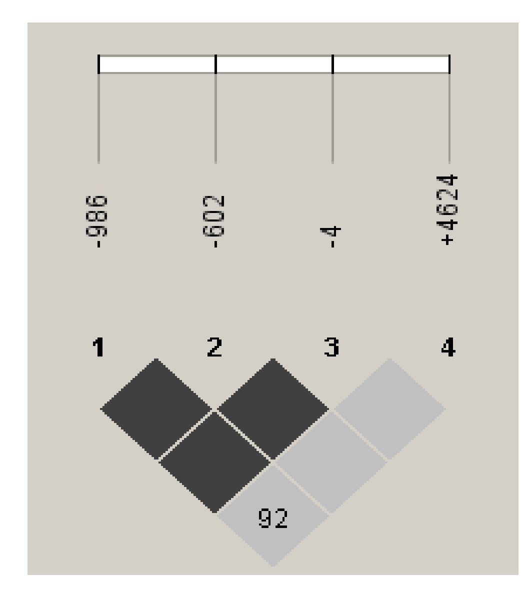
2-6-4-2-دراسة معامل الارتباط r^2 بين المواقع الأربعة في مجموعة المرضى: والنتـائج فـي الشكل التالي:



الشكل (90) يظهر معامل الارتباط بين المواقع الأربعة المدروسة في مجموعة المرضى.

نستنتج من الشكل أن الارتباط الأقوى وجد بين (986-،4-) حيث أنr^2=0.31 بينما الارتباط الأقل بين الموقع 6424+ وكل من4- و602-.

2-6-4-3-دراسـة درجـة الموثوقيـة (موثوقيـة الارتبـاط) بـين المواقـع الأربعـة المدروسـة فـي مجموعة المرضى:



الشكل (91) مخطط يظهر الارتباطات الموثوقة بين المواقع المدروسة في مجموعة المرضى.

نستنتج من الشكل السابق أن المواقع الأربعة تبدي درجات مختلفة من الارتباطات الموثوقـة وجد أقلها بين الموقع 6424+ والمواقع الأخرى المتبقية بـدون وجـود احتمـالات للتأشـب بينهـا (غيـاب المربعات البيضـاء).

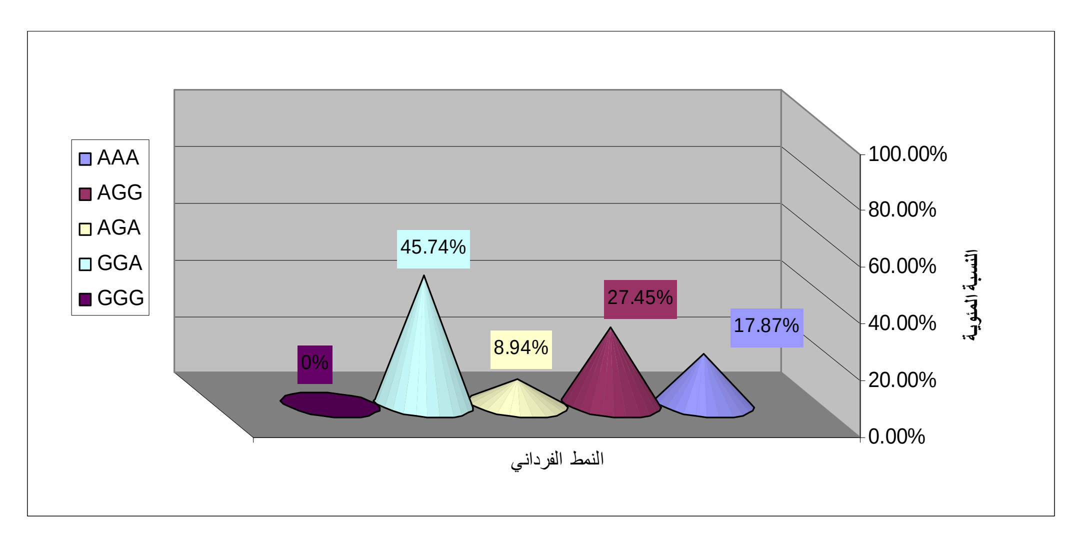
2-6-5-دراسة الأنماط الفردانية في مجموعة المرضى:

2-6-5-1-دراسة الأنماط الفردانية للمواقع (-4،-602،-986) الموجودة في منطقة المعزاز في مجموعة المرضى:

درسنا في هذه الفقرة تواتر الأنماط الفردانية للمواقع الوظيفية الثلاثة الموجودة في منطقة المعزاز وكانت النتائج كالتالي:

النمط الفرداني	العدد	النسبة المئوية
AAA	84	17.87%
AGG	129	27.45%
AGA	42	8.94%
GGA	215	45.74%
GGG	0	0%
المجموع	470	100%

الجدول (24) الأنماط الفردانية وتواتراتها للمواقع (-4،-602،-986) في مجموعة المرضى.



الشكل (92) توزع الأنماط الفردانية للمواقع (-4،-602،-986) في مجموعة المرضى.

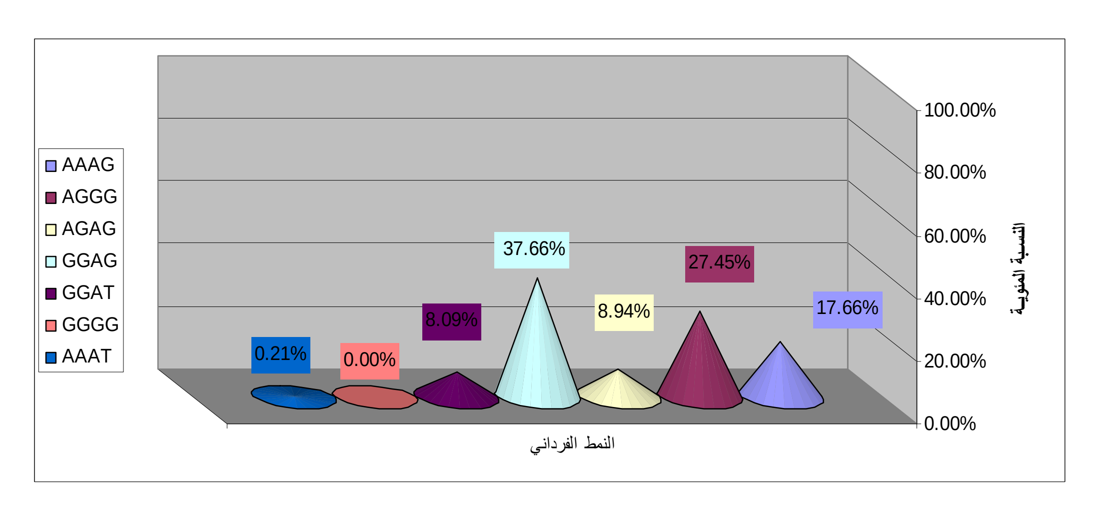
بالعودة إلى (الجدول 24) و(الشكل 92) نرى أن النمط الفرداني GGA احتل المرتبة الأولى بنسبة 45.74% بينما انعدم وجود النمط GGG.

2-6-5-2-دراسة الأنماط الفردانية للمواقع (+4624,-4،-602,-986) في مجموعة المرضى:

أضفنا في هذه الفقرة الموقع +6424 الموجود في الاكزون الثامن إلى المواقع السابقة وحسبنا تواترات الأنماط الفردانية الناتجة وكانت النتائج كالتالي:

النسبة المئوية	العدد	النمط الفرداني
17.66%	83	AAAG
27.45%	129	AGGG
8.94%	42	AGAG
37.66%	177	GGAG
8.09%	38	GGAT
0.00%	0	GGGG
0.21%	1	AAAT
100.00%	470	المجموع

الجدول (25) الأنماط الفردانية وتواتراتها للمواقع (+4624،-4،-602،-986) في مجموعة المرضى.



الشكل (93) توزع الأنماط الفردانية للمواقع (+4624،-4،-602،-986) في مجموعة المرضى.

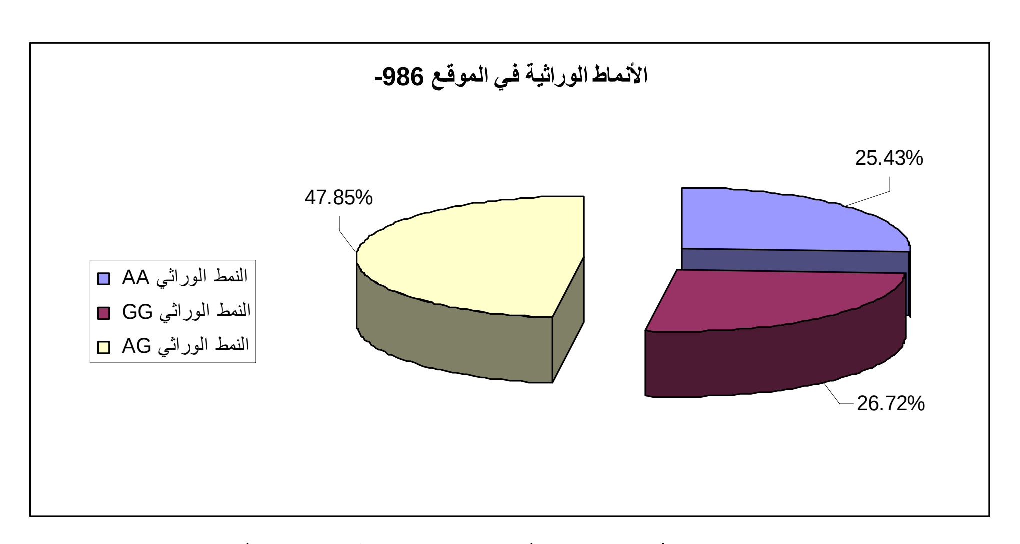
إذا بإضافة الموقع الوظيفي الأخير لم تتغير النتيجة كثيرا إذ احتل النمط الفرداني GGAG المرتبة الأولى مع غياب النمط GGGG.

2-6-6-دراسة تواتر الأنماط الوراثية و الآلائل للمواقع الوظيفية الأربعة (+6424،-4،-602،-986) من مورثة الفيكولين 2 في مجموعة الشواهد:

2-6-6-1-الموقع 986- (rs3124952): الذي يضم الأليلين A,G توزعت الأنماط الوراثية كما يلي:

النمط الوراثي للموقع 986-	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي AA	59	25.43%
النمط الوراثي GG	62	26.72%
النمط الوراثي AG	111	47.85%
المجموع	232	100.00%

الجدول (26) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 986- في مجموعة الشاهد .

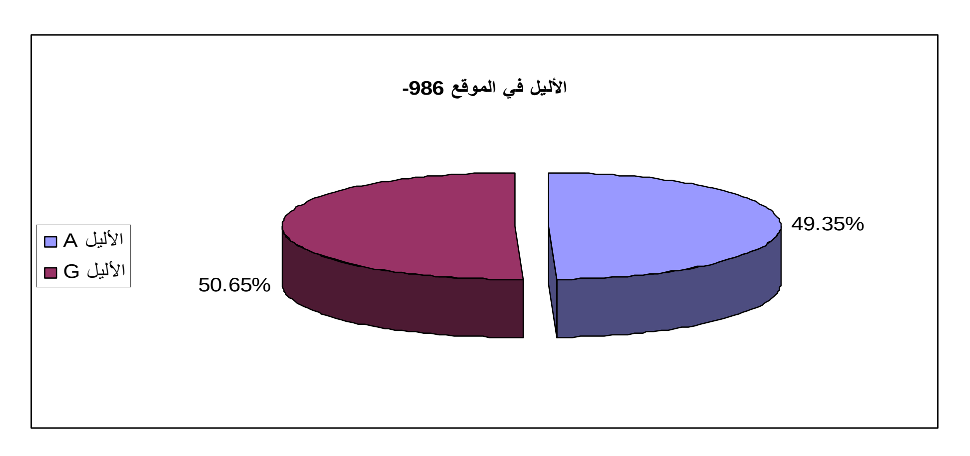


الشكل (94) توزع الأنماط الوراثية للموقع 986- في مجموعة الشاهد.

بينما توزعت الآلائل في هذا الموقع على النحو التالي:

الأليل في الموقع 986-	العدد	النسبة المئوية
الأليل A	229	49.35%
الأليل G	235	50.65%
المجموع	464	100.00%

الجدول (27) يبين عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 986- في مجموعة الشاهد.



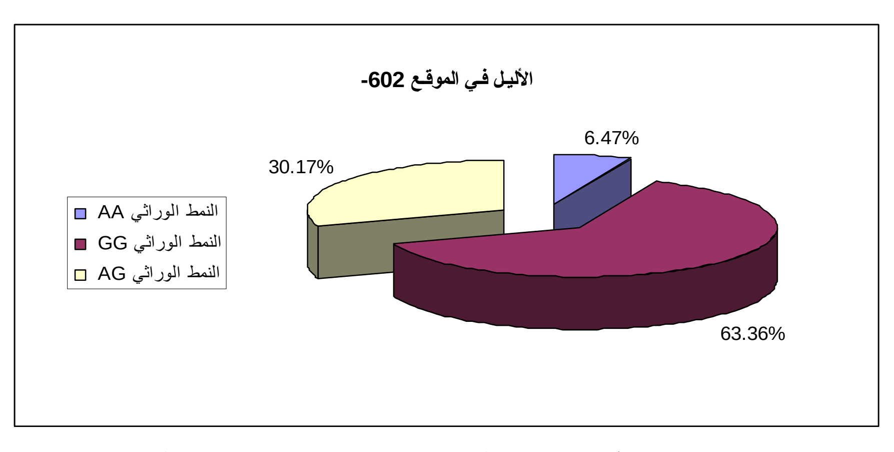
الشكل (95) توزع الأليلين A,G للموقع 986- في مجموعة الشاهد.

نستنتج مما سبق أن النمط الوراثي AG احتل نصف الحالات تقريبا وتوزع النصف الأخر تقريبا بالتساوي بين النمطين المتماثلي اللواقح المتبقيين AA,GG وتوزع الأليلين A,G مناصفة تقريبا (الشكل 94،95).

2-6-6-2-الموقع 602- (rs3124953): الذي يضم الأليلين A,G ولقد توزعت الأنماط الوراثية كالتالي:

النمط الوراثي للموقع 602-	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي AA	15	6.47%
النمط الوراثي GG	147	63.36%
النمط الوراثي AG	70	30.17%
المجموع	232	100.00%

الجدول (28) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 602- في مجموعة الشاهد.

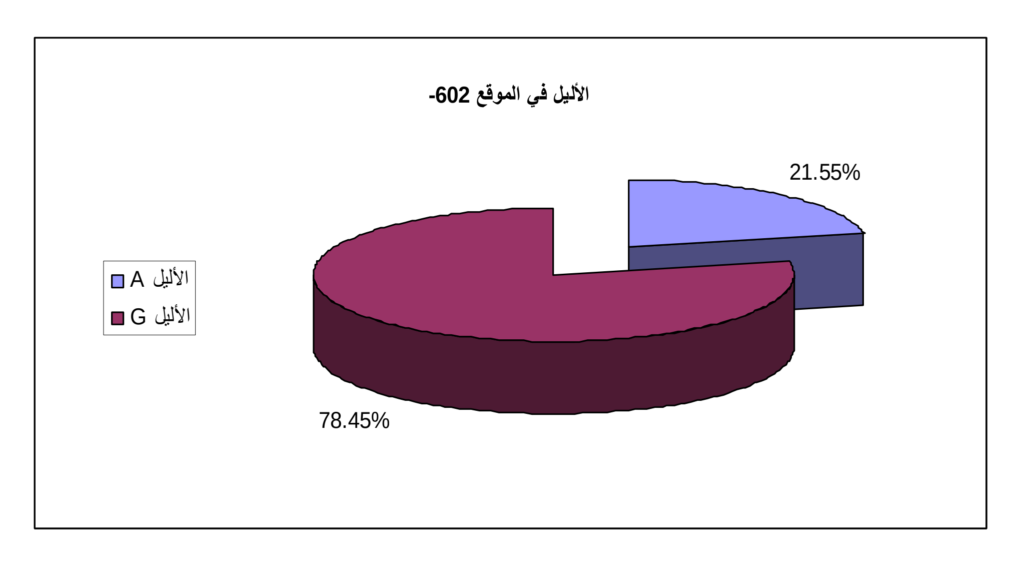


الشكل (96) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 602- في مجموعة الشاهد.

أما الآلائل فقد توزعت بالشكل التالي:

النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع -602
21.55%	100	الأليل A
78.45%	364	الأليل G
100.00%	464	المجموع

الجدول (29) يبين عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 602- في مجموعة الشاهد.



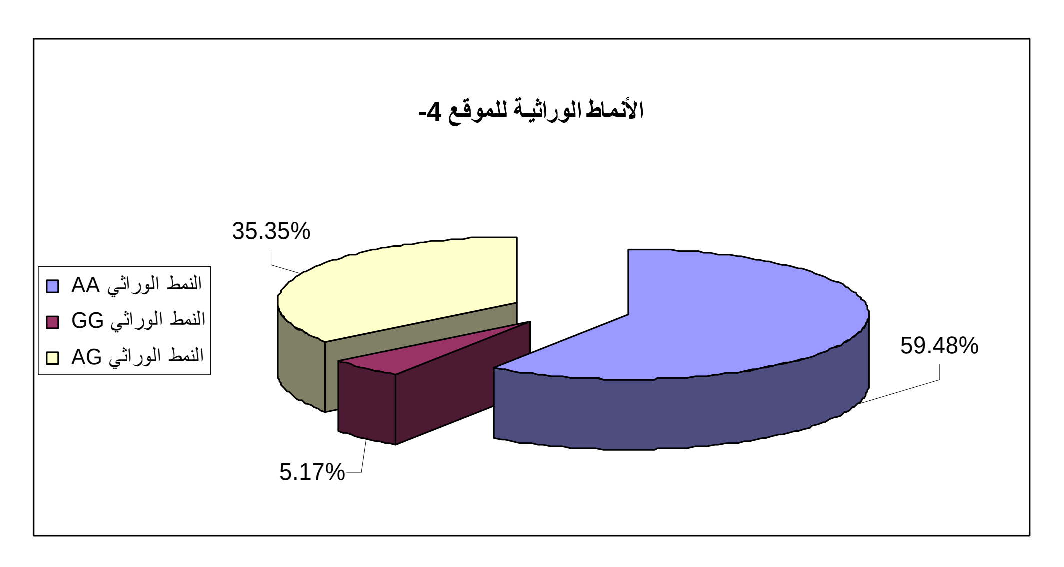
الشكل (97) توزع الأليلين A,G للموقع 602- في مجموعة الشاهد.

نستنتج مما سبق غلبة النمط الوراثي GG (الشكل 96)، إذ شكل الأليل G الأليل الرئيسي بينما الأليل A هو الأليل الأصغر في الموقع 602- عند مجموعة الشاهد (الشكل 97).

2-6-6-3-الموقع 4-(rs17514136): الذي يضم الأليلين A,G ولقد توزعت الأنماط الوراثية كما يلي:

النسبة المئوية	العدد	النمط الوراثي للموقع -4
59.48%	138	النمط الوراثي AA
5.17%	12	النمط الوراثي GG
35.35%	82	النمط الوراثي AG
100.00%	232	المجموع

الجدول (30) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 4- في مجموعة الشاهد.

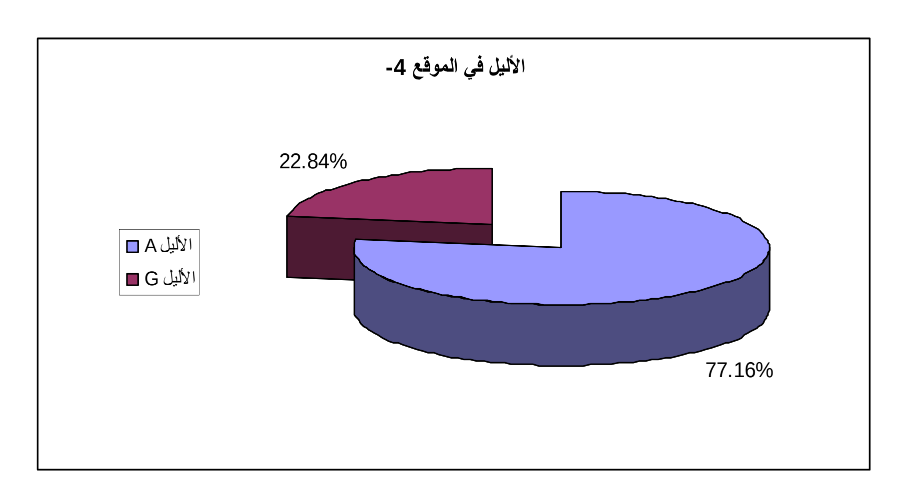


الشكل (98) توزع الأنماط الوراثية في الموقع 4- في مجموعة الشاهد.

أما الآلائل فقد توزعت كما في الجدول التالي:

الأليل في الموقع 4-	العدد	النسبة المئوية
الأليل A	358	77.16%
الأليل G	106	22.84%
المجموع	464	100.00%

الجدول (31) يبين عدد ونسبة الأليلين A,G للموقع 4- في مجموعة الشاهد.



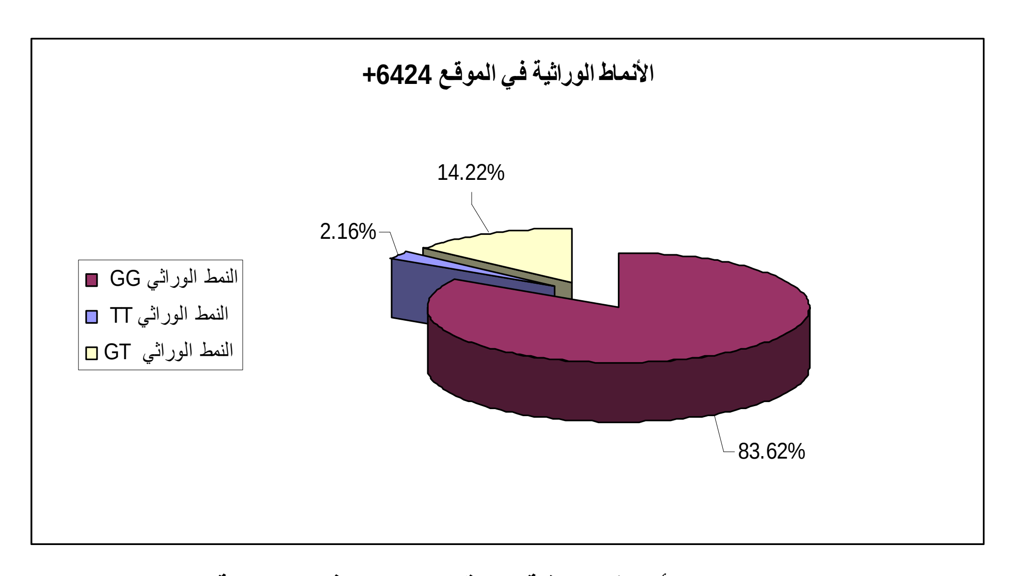
الشكل (99) توزع الأليلين A,G للموقع 4- في مجموعة الشاهد.

نستنتج مما سبق غلبة النمط الوراثي AA (الشكل 98)، إذ شكل الأليل A الأليل الرئيسي بينما الأليل G هو الأليل الأصغر في الموقع 4- عند مجموعة الشاهد (الشكل99).

2-6-6-4-الموقع 6424+ (rs7851696): الذي يضم الأليلين G,T توزعت الأنماط الوراثية في هذا الموقع كما يلي:

النمط الوراثي للموقع 6424+	العدد	النسبة المئوية
النمط الوراثي GG	194	83.62%
النمط الوراثي TT	5	2.16%
النمط الوراثي GT	33	14.22%
المجموع	232	100.00%

الجدول (32) يبين عدد ونسبة الأنماط الوراثية للموقع 6424+ في مجموعة الشاهد.

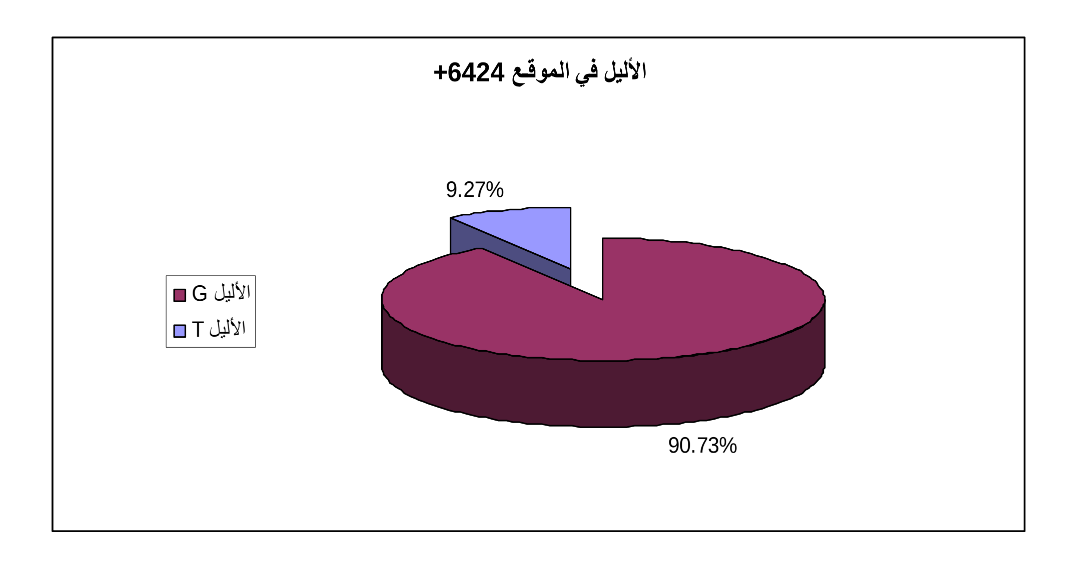


الشكل (100) توزع الأنماط الوراثية للموقع 6424+ في مجموعة الشاهد.

أما الآلائل فقد توزعت بالشكل التالي

الأليل في الموقع 6424+	العدد	النسبة المئوية
الأليل G	421	90.73%
الأليل T	43	9.27%
المجموع	464	100.00%

الجدول (33) يبين عدد ونسبة الأليلين T,G للموقع 6424+ في مجموعة الشاهد.

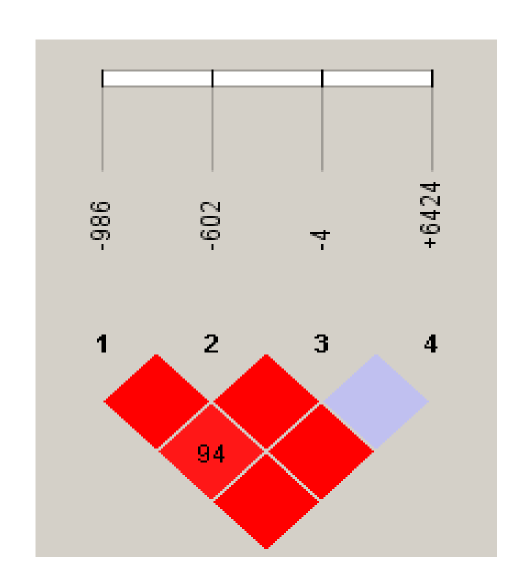


الشكل (101) توزع الأليلين T,G للموقع 6424+ في مجموعة الشاهد.

نلاحظ من الجدولين السابقين غلبة النمط الوراثي GG (الشكل 100) إذ شكل الأليل G الأليل الرئيسي في الموقع 6424+ عند مجموعة الشاهد أيضا (الشكل 101).

2-6-7-دراسة LD للمواقع الوظيفية الأربعة (6424+،4-،602-،986-) من مورثة الفيكولين 2 في مجموعة الشاهد:

2-6-7-1-دراسة معامل الـ LD (LD coefficient=D') وLOD: والنتائج في الشكل التالي :



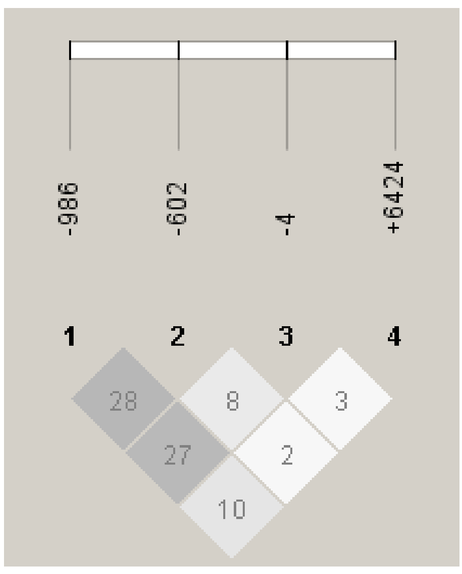
الشكل(102) يفسر LD بين المواقع الأربعة باستخدام برنامج Haploview وتشير الأرقام داخل المربعات إلى قيمة 'D معبرا عنها بشكل نسبة مئوية.

من الملاحظ من الشكل السابق أن الارتباط كان قويا بين كل المواقع بدرجات مختلفة ماعدا الموقعين (4-،6424+) إذ بلغت LOD 1.51 كما يوضح لنا الجدول التالي:

r^2	LOD	D'	الموقع 2	الموقع 1
0.28	24.24	1	-602	-986
0.27	17.91	0.95	-4	-986
0.1	6.71	1	6424	-986
0.08	6.91	1	-4	-602
0.03	2.38	1	6424	-602
0.03	1.51	1	6424	-4

الجدول (34) يوضح درجات الارتباط بين المواقع المدروسة في مجموعة الشاهد.

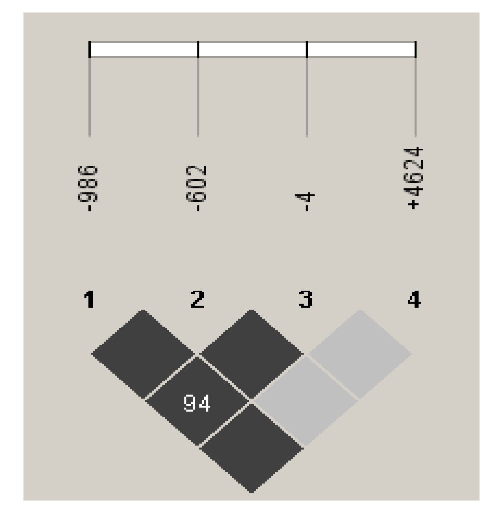
2-6-7-2-دراسة معامل الارتباط r^2 بين المواقع الأربعة في مجموعة الشاهد: والنتائج في الشكل التالي :



الشكل (103) يظهر معامل الارتباط بين المواقع المدروسة في مجموعة الشاهد.

نستنتج أن معامل الارتباط الأقوى بين الموقع 986- وكل من الموقعين 602- و4- حيث أن $r^2=0.28$ و 0.27 على التوالي وأن الارتباط الأضعف وجد بين الموقعين (602-،6424+).

2-6-7-3-دراسة درجة الموثوقية بين المواقع الأربعة المدروسة في مجموعة الشاهد:



الشكل (104) مخطط يظهر الارتباطات الموثوقة بين المواقع الأربعة المدروسة في مجموعة الشاهد.

من الملاحظ وجود اختلافات في موثوقية الارتباطات بين المواقع والنسبة الأقل بين 6424+ وكل من 4- و602- مع غياب احتمالات التأشب بين المواقع الأربعة المذكورة في مجموعة الشاهد .

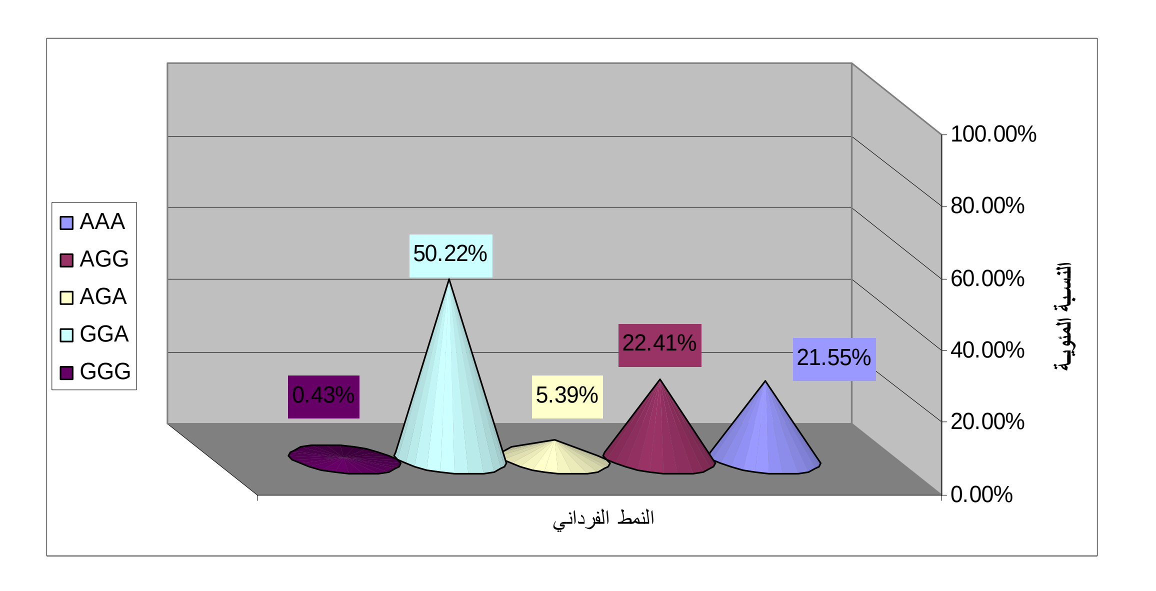
2-6-8-دراسة الأنماط الفردانية في مجموعة الشاهد:

2-6-8-1-دراسة الأنماط الفردانية للمواقع (4-،602-،986-) الموجودة في منطقة المعزاز عند مجموعة الشاهد:

وكما هو الحال بالنسبة لمجموعة المرضى درسنا الأنماط الفردانية الممكنة للمواقع الوظيفية الثلاثة في منطقة محفز النسخ وتواتر كل منها والنتائج في الجدول التالي :

النمط الفرداني	العدد	النسبة المئوية
AAA	100	21.55%
AGG	104	22.41%
AGA	25	5.39%
GGA	233	50.22%
GGG	2	0.43%
المجموع	464	100%

الجدول (35) الأنماط الفردانية وتواتراتها للمواقع (4-،602-،986-) في مجموعة الشاهد.



الشكل (105) توزع الأنماط الفردانية للمواقع (-4،-602،-986) في مجموعة الشاهد.

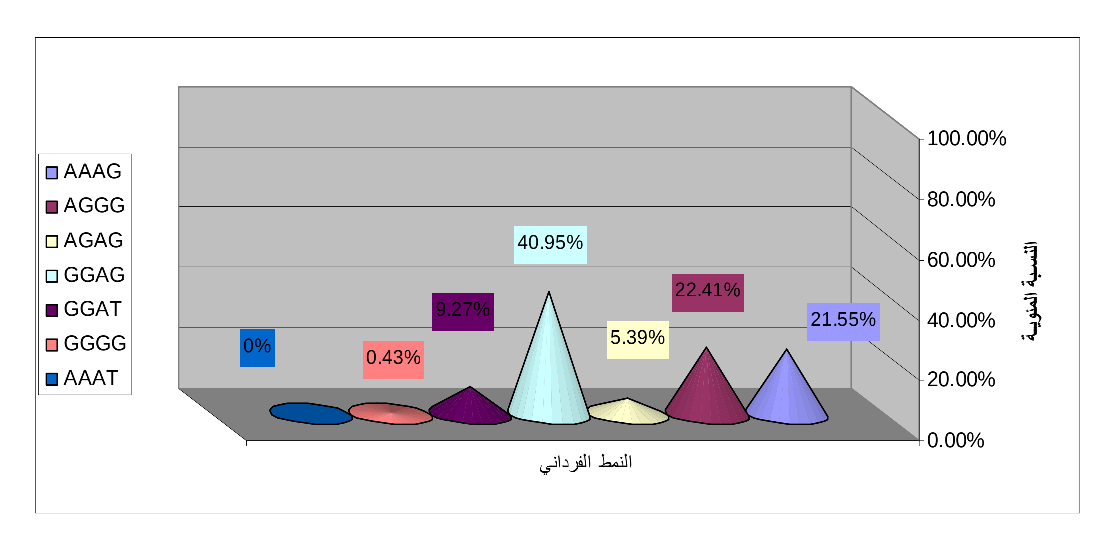
وكما هو الحال بالنسبة للمرضى بقي النمط الفرداني GGA بالمرتبة الأولى بنسبة 50.22% بينما وجد النمط الفرداني GGG بتواتر قليل .

2-6-8-2-دراسة الأنماط الفردانية للمواقع (+4624،-4,-602,-986) في مجموعة الشاهد:

عند إضافة الموقع +6424في الاكزون الثامن إلى المواقع السابقة كانت الأنماط الفردانية المتشكلة وتوتراتها كالتالي:

النمط الفرداني	العدد	النسبة المئوية
AAAG	100	21.55%
AGGG	104	22.41%
AGAG	25	5.39%
GGAG	190	40.95%
GGAT	43	9.27%
GGGG	2	0.43%
AAAT	0	0%
المجموع	464	100%

الجدول (36) الأنماط الفردانية وتواتراتها للمواقع (+4624،-4،-602،-986) في مجموعة الشاهد.



الشكل (106) توزع الأنماط الفردانية للمواقع (+4624،-4،-602،-986) في مجموعة الشاهد.

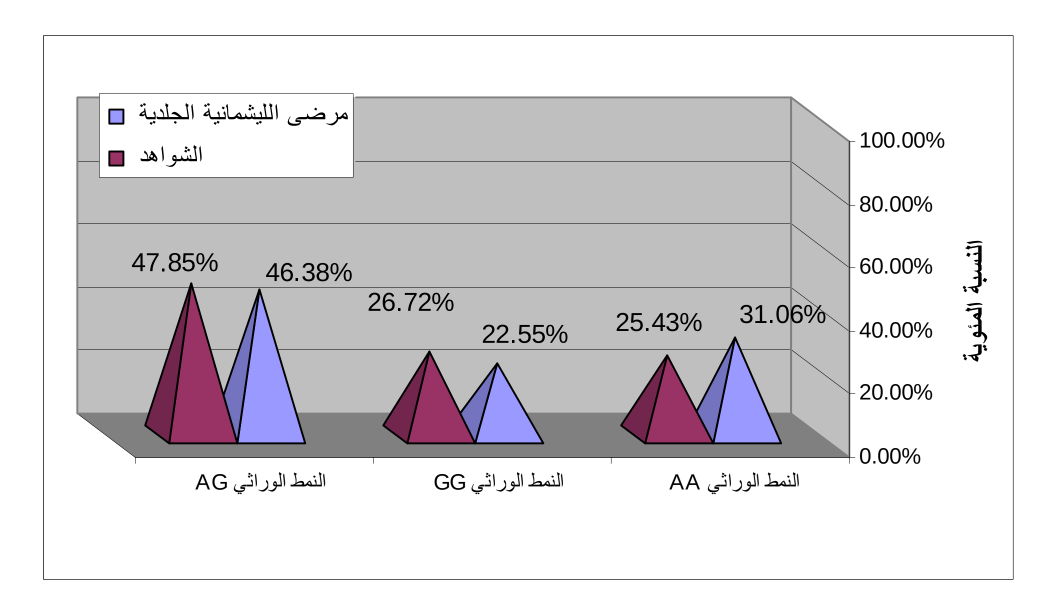
إذا بإضافة الموقع الوظيفي الأخير لم تتغير النتيجة كثيرا بقي النمط الفرداني GGAG محتلا المرتبة الأولى وبقيت نسبة النمط GGGG لم تتغير (الشكل 106).

2-6-9-مقارنة تواتر الأنماط الوراثية للمواقع الوظيفية الأربعة (+6424،-4،-602، -986) من مورثة الفيكولين 2 بين المرضى والشواهد:

2-6-9-1-الموقع 986-: باستخدام اختبار كاي مربع لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي بتوزع الأنماط الوراثية AA,AG,GG بين المرضى والشواهد (χ^2 =2.19 و P=0.34، درجة الحرية =2) كما يظهر الجدول التالي:

النمط الوراثي للموقع -986	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية		
النمط الوراثي AA	73	31.06%	59	25.43%	1.82	0.18
النمط الوراثي GG	53	22.55%	62	26.72%	1.09	0.3
النمط الوراثي AG	109	46.38%	111	47.85%	0.1	0.75
المجموع	235	100%	232	100%	2.19	0.34

الجدول (37) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 986-.

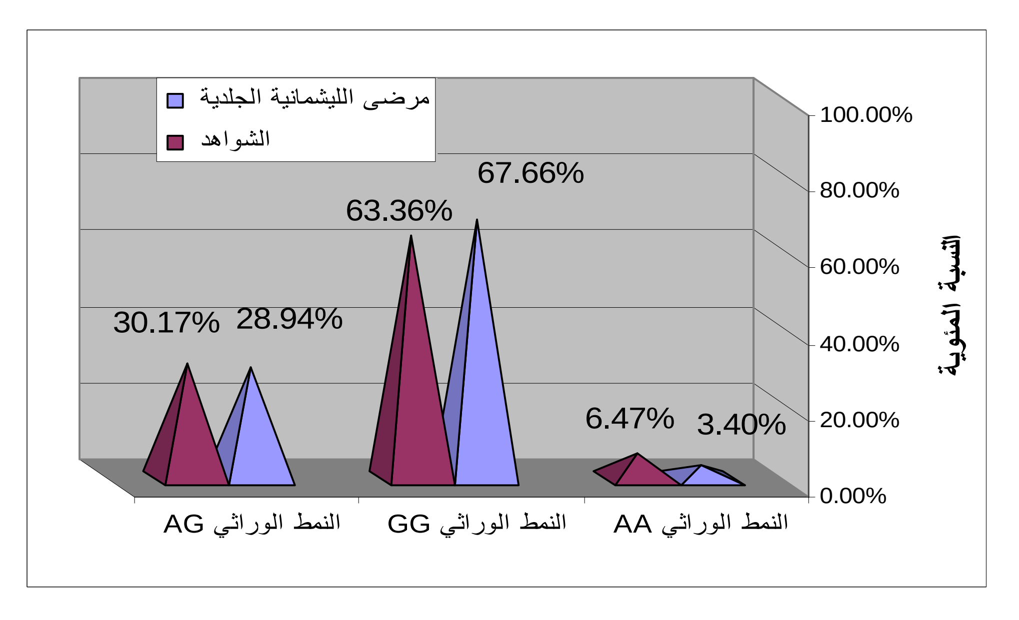


الشكل (107) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 986-.

2-6-9-2-الموقع 602-: باستخدام اختبار كاي مربع لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي للأنماط الوراثية AA,AG,GG بين المرضى والشواهد (χ^2 =2.61 وP=0.27، درجة الحرية=2) كما في الجدول التالي:

النمط الوراثي للموقع 602-	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية		
النمط الوراثي AA	8	3.40%	15	6.47%	2.34	0.13
النمط الوراثي GG	159	67.66%	147	63.36%	0.95	0.33
النمط الوراثي AG	68	28.94%	70	30.17%	0.09	0.77
المجموع	235	100%	232	100%	2.61	0.27

الجدول (38) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 602-.

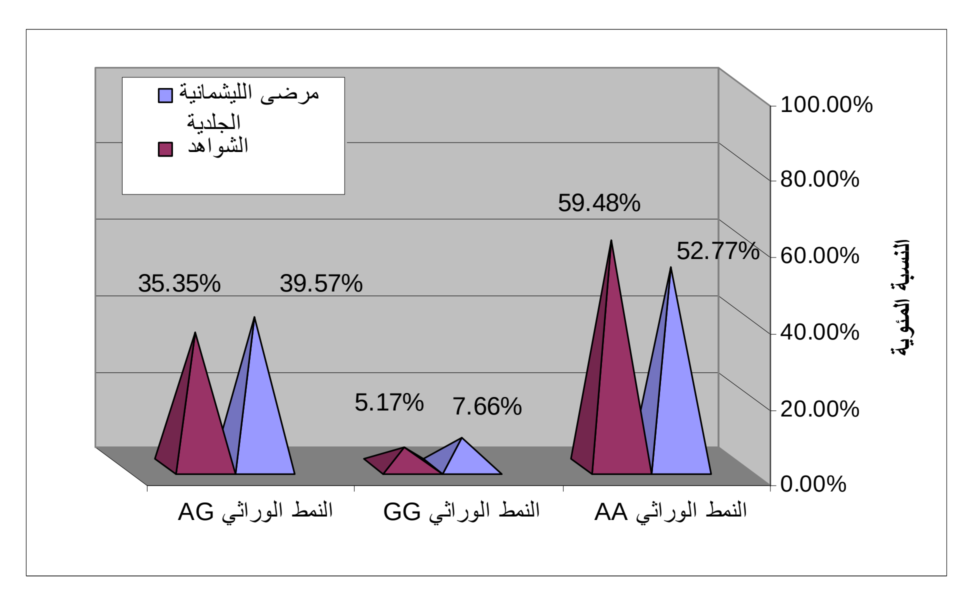


الشكل (108) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 602-.

2-6-9-3-الموقع 4-: باستخدام اختبار كاي مربع لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي بتوزع الأنماط الوراثية AA,AG,GG بين المرضى والشواهد (χ^2 =2.62) وP=0.27، درجة الحرية=2) كما يظهر الشكل والمخطط التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
النمط الوراثي للموقع 4-	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية		
النمط الوراثي AA	124	52.77%	138	59.48%	2.14	0.14
النمط الوراثي GG	18	7.66%	12	5.17%	1.2	0.27
النمط الوراثي AG	93	39.57%	82	35.35%	0.89	0.35
المجموع	235	100%	232	100%	2.62	0.27

الجدول (39) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 4-.



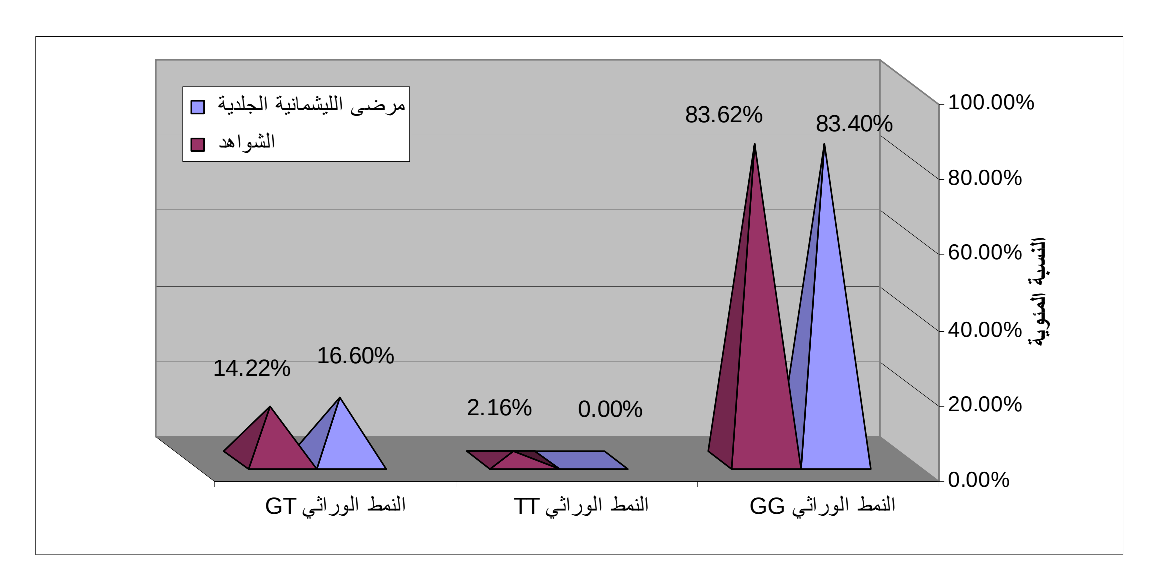
الشكل (109) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 4-.

2-6-9-4-الموقع 6424+: ارتفع تواتر النمط الوراثي TT عند الشواهد إذ وجدت 5 حالات من أصل 232 بينما لم نجد ولا حالة عند مجموعة المرضى وعددهم 235 (P=0.03) وذلك باستخدام Fisher exact test كونه الاختبار المناسب إحصائيا في هذه الحالة على الرغم من عدم وجود فرق ذو مغزى إحصائي بتوزع الأنماط الوراثية TT,GT,GG بين المرضى والشواهد (χ^2 =5.49 وP=0.06، درجة الحرية=2).

النمط الوراثي للموقع +6424	مرضى الليشمانية الجلدية: العدد	مرضى الليشمانية الجلدية: النسبة المئوية	الشواهد: العدد	الشواهد: النسبة المئوية	χ^2	P
النمط الوراثي GG	196	83.40%	194	83.62%	0.004	0.95
النمط الوراثي TT	0	0.00%	5	2.16%		*0.03
النمط الوراثي GT	39	16.60%	33	14.22%	0.5	0.48
المجموع	235	100%	232	100%	5.49	0.06

الجدول (40) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 6424+.

تشير * إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر كونه المناسب إحصائيا.



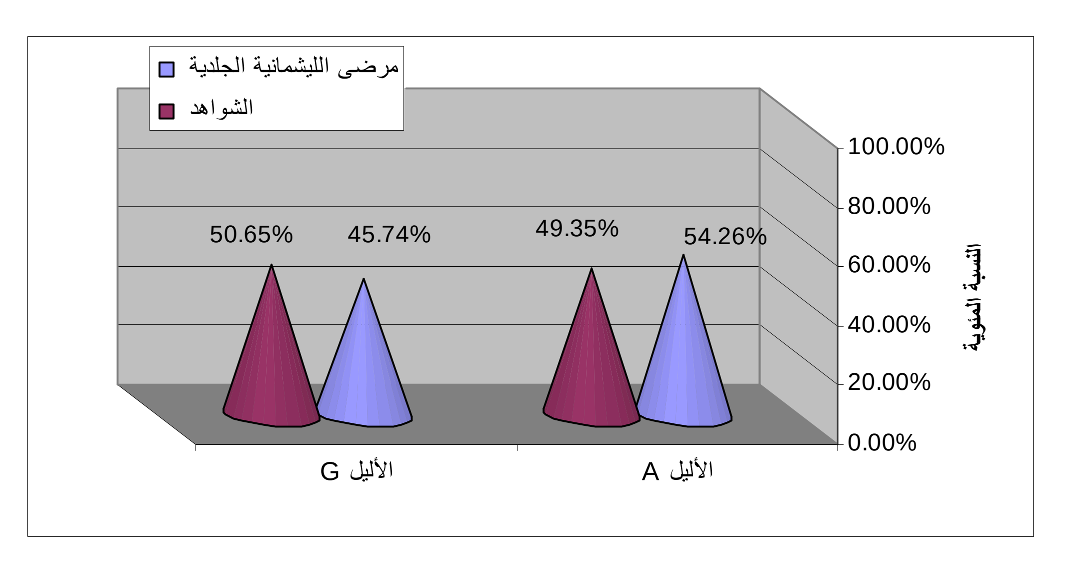
الشكل (110) مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد في الموقع 6424+.

2-6-10-مقارنة تواتر الآلائل للمواقع الوظيفية الأربعة (6424+،4-،602-،986-) من مورثة الفيكولين 2 بين المرضى والشواهد:

2-6-10-1-الموقع 986-: باستخدام اختبار كاي مربع لم نجد هناك فرق ذو مغزى إحصائي للأليلين A,G بين المرضى والشواهد (χ^2 =2.25 وP=0.13، درجة الحرية=1) وهذا ما يوضحه الجدول التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
الأليل في الموقع 986-	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية		
الأليل A	255	54.26%	229	49.35%	2.25	0.13
الأليل G	215	45.74%	235	50.65%		
المجموع	470	100%	464	100%		

الجدول (41) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 986-.

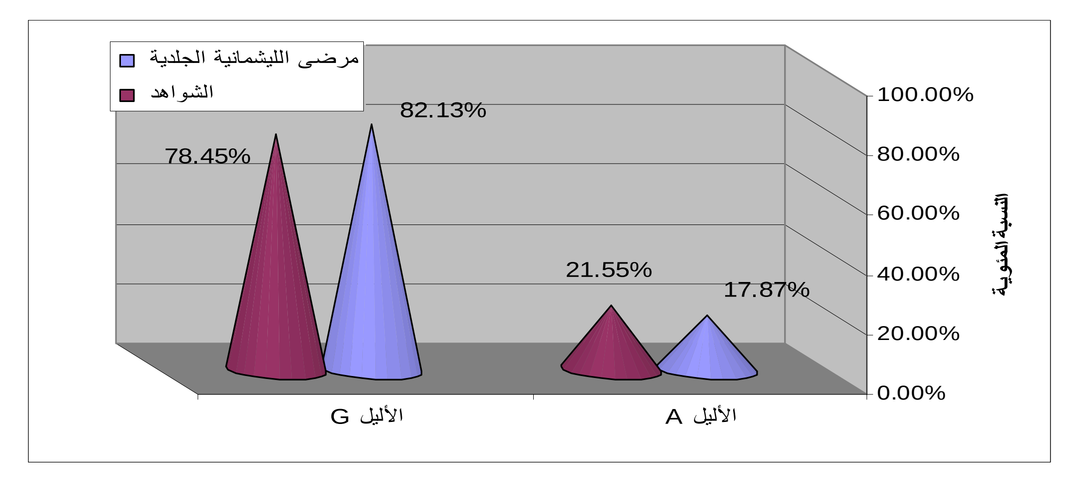


الشكل (111) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 986.

2-6-10-2-الموقع 602:- باستخدام اختبار كاي مربع لم نجد هناك فرق ذو مغزى إحصائي للأليلين A,G بين المرضى والشواهد (χ^2 =2 و P=0.16، درجة الحرية=1) وهذا ما يوضحه الجدول التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
الأليل في الموقع -602	**العدد**	**النسبة المئوية**	**العدد**	**النسبة المئوية**	2	0.16
الأليل A	84	17.87%	100	21.55%		
الأليل G	386	82.13%	364	78.45%		
المجموع	470	100%	464	100%		

الجدول (42) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 602.

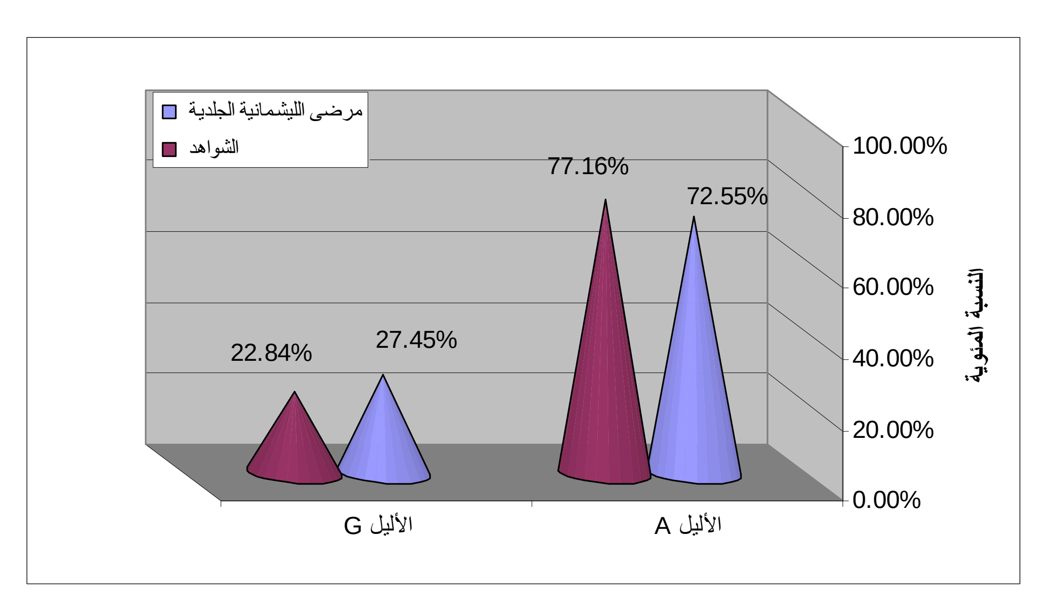


الشكل (112) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 602.

2-6-10-3-الموقع 4-: باستخدام اختبار كاي مربع لم نجد هناك فرق ذو مغزى إحصائي للأليلين A,G بين المرضى والشواهد (χ^2 =2.63 وP=0.11، درجة الحرية=1) وهذا ما يظهره الجدول التالي:

الأليل في الموقع 4-	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية		
الأليل A	341	72.55%	358	77.16%	2.63	0.11
الأليل G	129	27.45%	106	22.84%		
المجموع	470	100.00%	464	100.00%		

الجدول (43) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 4-.

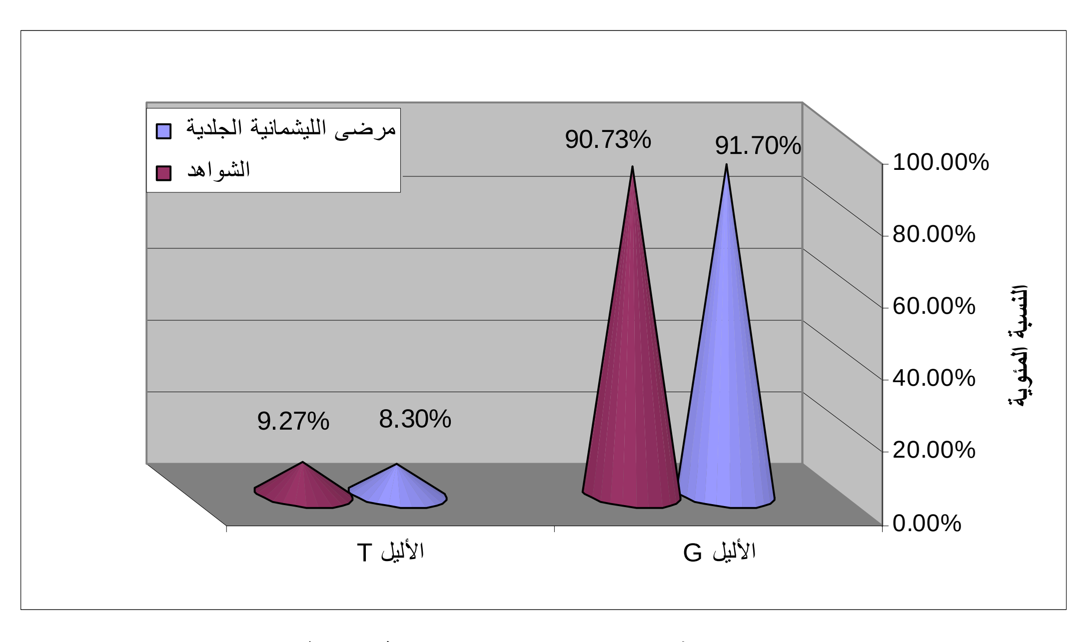


الشكل (113) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 4-.

2-6-10-4-الموقع 6424+: باستخدام اختبار كاي مربع لم يكن هناك فرق ذو مغزى إحصائي للأليلين G,T بين المرضى والشواهد (χ^2=0.27، P=0.6، درجة الحرية=1) كما في الجدول التالي:

P	χ^2	الشواهد		مرضى الليشمانية الجلدية		
		النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع +6424
0.6	0.27	90.73%	421	91.70%	431	الأليل G
		9.27%	43	8.30%	39	الأليل T
		100%	464	100%	470	المجموع

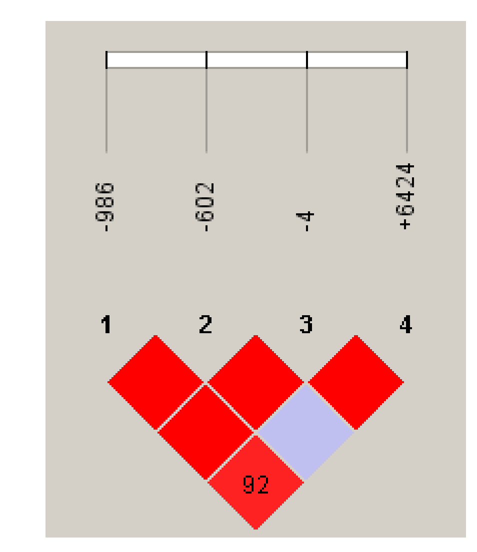
الجدول (44) مقارنة توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 6424+.

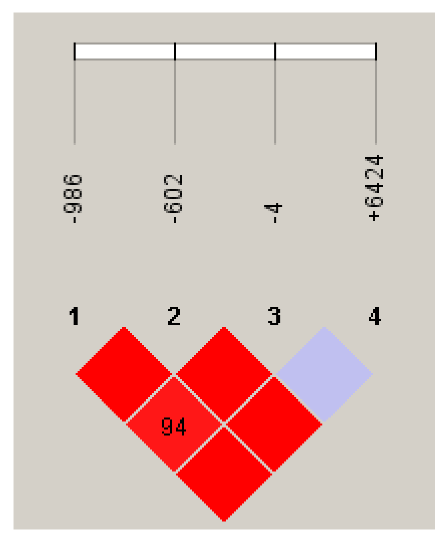


الشكل (114) توزع الآلائل بين المرضى والشواهد في الموقع 6424+.

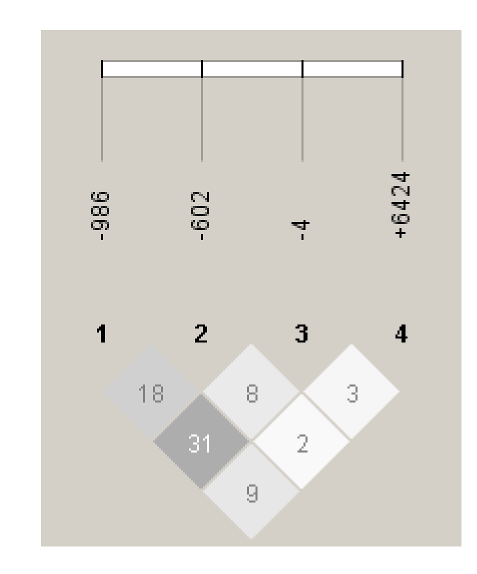
2-6-11- مقارنة الـ LD بين المرضى والشواهد:

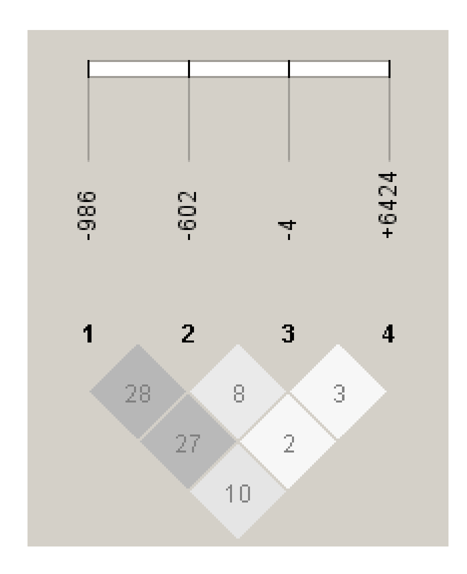
عند مقارنة مجموعتي المرضى والشواهد من حيث الارتباط بين المواقع وجد الارتباط الأقل بين الموقعين (602-،6424+) عند المرضى مقابل (4-،6424+)عند الشواهد (الشكل 115)، ولكن عند مقارنة معاملات الارتباط بين المواقع كانت متقاربة بين المجموعتين (الشكل 116) وكذلك الحال غابت احتمالات التأشب في كلتا المجموعتين (الشكل 117).



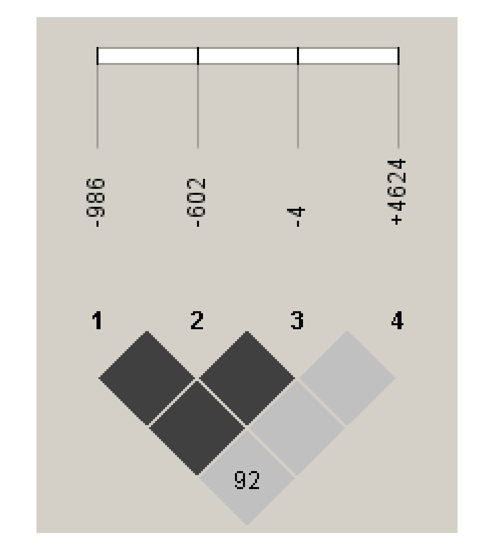


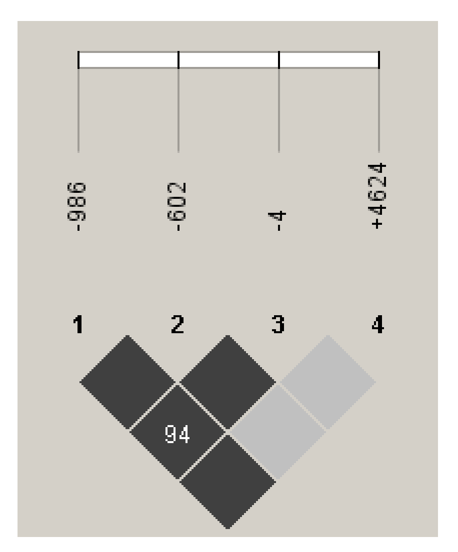
الشكل (115) مقارنة الـ LD للمواقع الأربعة بين مجموعة المرضى على اليمين ومجموعة الشواهد على اليسار باستخدام برنامج Haploview وتشير الأرقام داخل المربعات إلى قيمة D' معبرا عنها بشكل نسبة مئوية.





الشكل (116) يظهر المخطط مقارنة معامل الارتباط للمواقع الأربعة بين مجموعة المرضى على اليمين ومجموعة الشواهد على اليسار .





الشكل (117) مقارنة الارتباطات الموثوقة للمواقع الأربعة المدروسة بين مجموعة المرضى على اليمين ومجموعة الشواهد على اليسار.

		مرضى الليشمانية الجلدية			الشواهد		
الموقع 1	**الموقع 2**	**D'**	**LOD**	r^2	**D'**	**LOD**	r^2
-986	-602	1	12.99	0.18	1	24.24	0.28
-986	-4	1	26.34	0.32	0.95	17.91	0.27
-986	6424	0.92	5.87	0.09	1	6.71	0.1
-602	-4	1	7.73	0.08	1	6.91	0.08
-602	6424	1	1.09	0.02	1	2.38	0.03
-4	6424	1	2.41	0.03	1	1.51	0.03

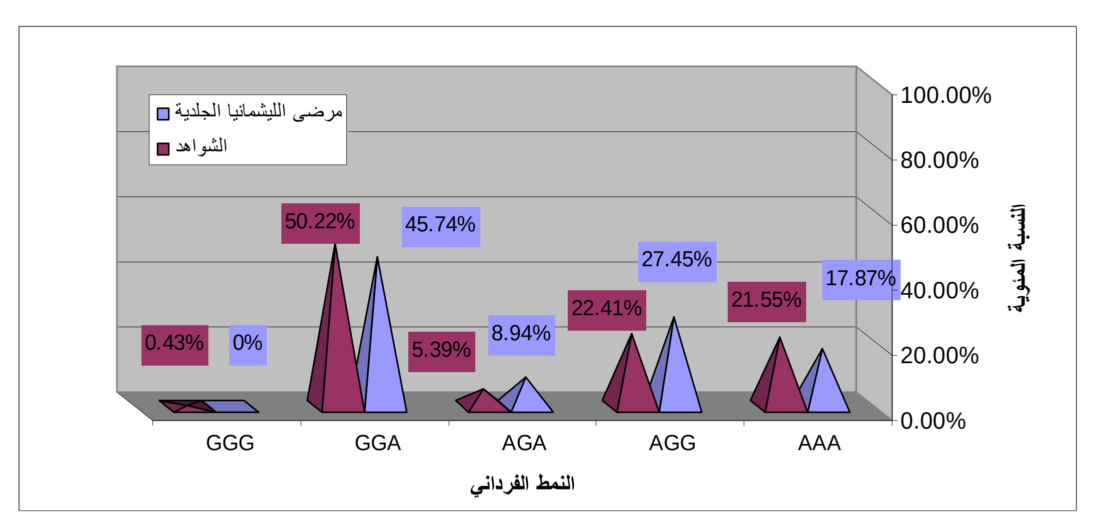
الجدول (45) مقارنة قيم D', LOD, r^2 بين المرضى والشواهد.

2-6-12-مقارنة تواتر الأنماط الفردانية بين مجموعة المرضى والشواهد:

2-6-12-1-مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع (4-،602-،986-) الموجودة في منطقة المعزاز: استخدم في البداية برنامج الـ Arlequin version3 لحساب تواتر الأنماط الفردانية في كل مجموعة، وثم حسبت قيمة P باستخدام اختبار كاي مربع وأحيانا اختبار التصحيح لفشر بالاعتماد على برنامج Stata لمقارنة كل نمط من الأنماط الفردانية بين المرضى والشواهد فكانت النتائج كما في الجدول التالي :

CI 95%	OR	P	χ^2	الشواهد		مرضى الليشمانية الجلدية		
				النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النمط الفرداني
غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق	0.16	2	21.55%	100	17.87%	84	AAA
غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق	0.076	3.16	22.41%	104	27.45%	129	AGG
1-3	1.7	0.036	4.41	5.39%	25	8.94%	42	AGA
غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق	0.17	1.87	50.22%	233	45.74%	215	GGA
غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق	*0.5		0.43%	2	0%	0	GGG
غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق	0.026	11.07	100%	464	100%	470	المجموع

الجدول (46) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 4- ,602- ,986- بين مرضى الليشمانية الجلدية والشواهد تعني الـ OR الـOdds ratio نسبة الأرجحية للنمط الفرداني الحالي بالنسبة للبقية، حسبت P باستخدام اختبار كاي مربع بينما تشير * إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر.



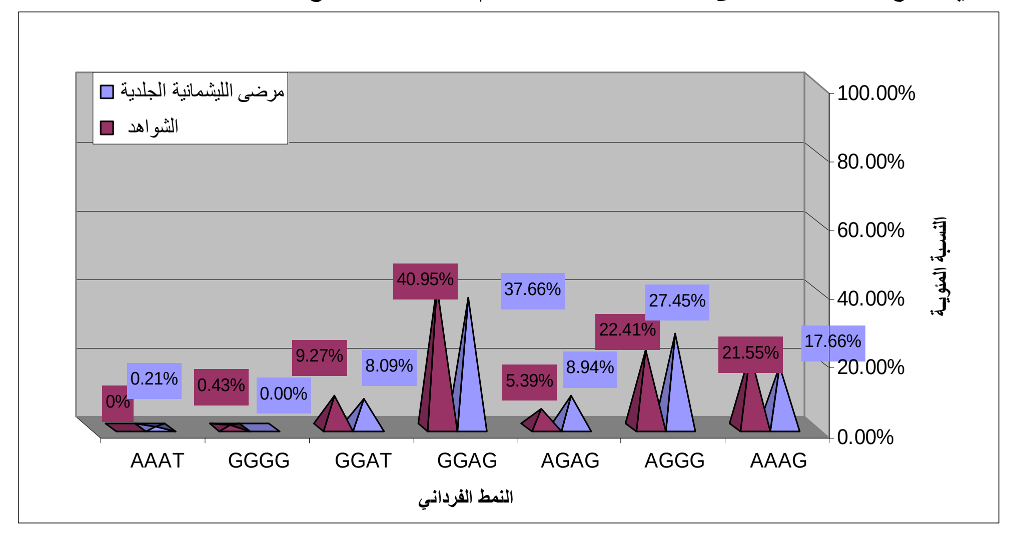
الشكل (118) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 4-،602-،986- بين مرضى الليشمانية الجلدية والشواهد.

فإذا عند مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع الوظيفية في منطقة المعزاز وهي (4-،602-،986-) وجد فرق ذو مغزى إحصائي بتوزع تلك الأنماط بين مرضى الليشمانية الجلدية والشواهد P=0.026، وكان النمط الفرداني AGA مرتفعا عند مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة الشواهد إذ بلغت نسبته 8.94% ,42/470 عند المرضى مقابل 5.39% ,25/464 عند الشواهد وكانت P=0.036 مع نسبة أرجحية OR=1.7 وفاصلة الثقة 95=1–3 CI 95% (الجدول 46).

2-6-12-2-مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع (+4624،-4،-602،-986) بين المرضى و الشواهد: بإضافة الموقع +6424 في الاكزون الثامن للمواقع السابقة الموجودة في منطقة المعزاز أصبحت النتائج بالشكل التالي:

النمط الفرداني	مرضى الليشمانية الجلدية		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية				
AAAG	83	17.66%	100	21.55%	2.25	0.14	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AGGG	129	27.45%	104	22.41%	3.16	0.076	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AGAG	42	8.94%	25	5.39%	4.41	0.036	1.7	1-3
GGAG	177	37.66%	190	40.95%	1.06	0.3	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
GGAT	38	8.09%	43	9.27%	0.41	0.52	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
GGGG	0	0.00%	2	0.43%	غير قابلة للتطبيق	0.5*	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AAAT	1	0.21%	0	0%	غير قابلة للتطبيق	1*	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
المجموع	470	100.00%	464	100%	12.31	0.055	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق

الجدول (47) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع +4624, -4, -602, -986- بين مرضى الليشمانية الجلدية والشواهد تعني الـ OR نسبة الأرجحية للنمط الفرداني الحالي بالنسبة للبقية، حسبت P باستخدام اختبار كاي مربع بينما تشير * إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر.



الشكل (119) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع +4624, -4, -602, -986- بين مرضى الليشمانية الجلدية والشواهد.

بعد إضافة الموقع 6424+ إلى المواقع الثلاثة السابقة بقي النمط الفرداني AGAG الذي يترافق مع المستوى الطبيعي للفيكولين في الدم مرتفعا عند المرضى بالمقارنة مع الشواهد، إذ بلغ عند المرضى 42/470, 8.94% مقابل 25/464, 5.39% عند الشواهد وكانت P=0.036 مع نسبة أرجحية OR=1.7، فاصلة الثقة CI95% 1–3 وذلك على الرغم من عدم وجود فرق بتوزع الأنماط الفردانية بين المجموعتين P=0.055 (الجدول 47).

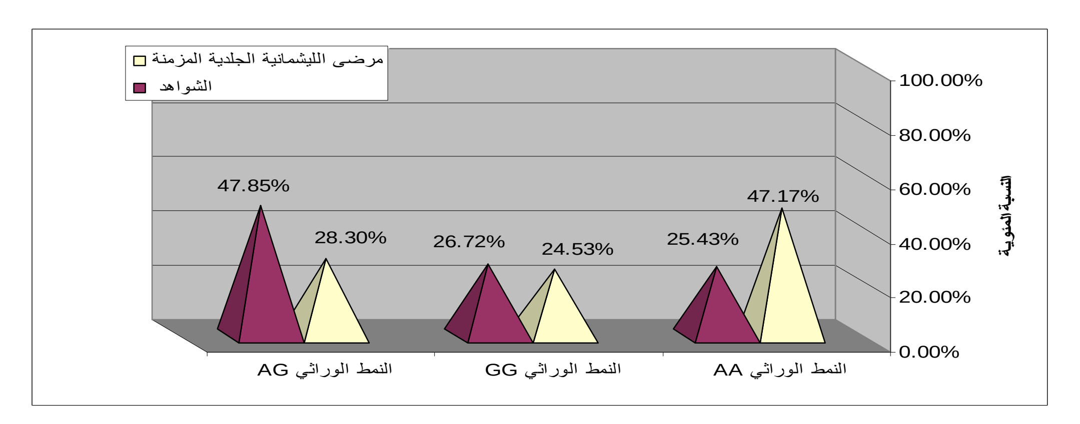
من ضمن مرضى الليشمانية كان هناك 53 حالة إزمان استمرت فيها الأفة لمدة تزيد على السنتين درست تواتر الأنماط الوراثية و الآلائل في المواقع الأربعة وكذلك الأنماط الفردانية لهذه المواقع وقورنت مع مجموعة الشواهد وكانت النتائج كالتالي:

2-6-13-مقارنة تواتر الأنماط الوراثية للمواقع (6424+،4-،602-،986-) من مورثة الفيكولين 2 بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد:

2-6-13-1-الموقع 986-: لدى مقارنة الأنماط الوراثية بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد في هذا الموقع وجدنا فرق ذو مغزى إحصائي بين هاتين المجموعتين P=0.005 إذ ارتفع تواتر النمط الوراثي AA، P=0.002 وانخفض تواتر النمط AG ،P=0.01 عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد والنتائج في الجدول التالي :

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الوراثي للموقع-986	**العدد**	**النسبة المئوية**	**العدد**	**النسبة المئوية**				
النمط الوراثيAA	25	47.17%	59	25.43%	9.81	0.002	2.62	1.42-4.84
النمط الوراثيGG	13	24.53%	62	26.72%	0.11	0.74		
النمط الوراثيAG	15	28.30%	111	47.85%	6.68	0.01	0.43	0.22-0.82
المجموع	53	100.00%	232	100.00%	10.72	0.005		

الجدول (48) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

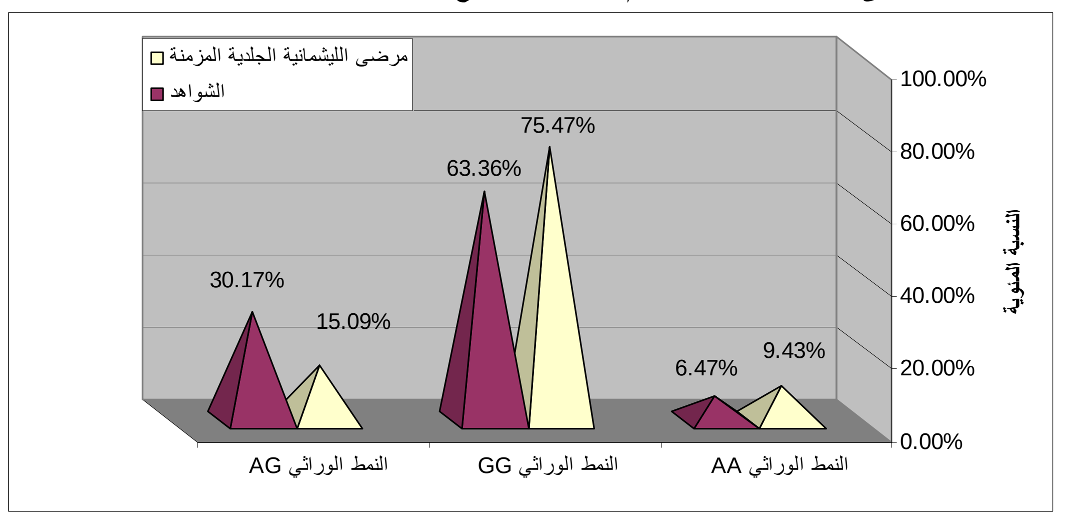


الشكل (120) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

2-6-13-2-الموقع 602-: لدى مقارنة توزع الأنماط الوراثية بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد في الموقع 602- انخفض تواتر النمط AG عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد P=0.026 والنتائج في الجدول التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الوراثي للموقع 602-	**العدد**	**النسبة المئوية**	**العدد**	**النسبة المئوية**				
النمط الوراثي AA	5	9.43%	15	6.47%		*0.55		
النمط الوراثي GG	40	75.47%	147	63.36%	2.80	0.09		
النمط الوراثي AG	8	15.09%	70	30.17%	4.93	0.026	0.41	0.18-0.92
المجموع	53	100.00%	232	100.00%	5.09	0.08		

الجدول (49) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 602- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد، تشير* إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر.

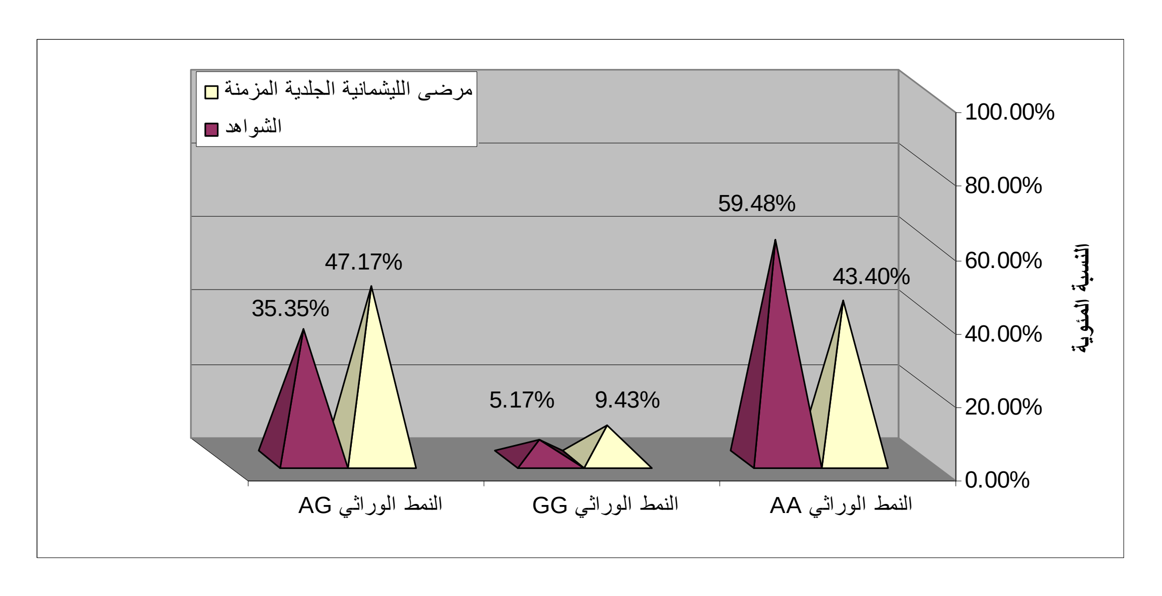


الشكل (121) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 602- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

2-6-13-3-الموقع 4-: انخفض تواتر النمط الوراثي AA عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد P=0.03 على الرغم من عدم وجود فرق بتوزع الأنماط الوراثية بين المجموعتين P=0.09 في هذا الموقع والنتائج موضحة في الجدول التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الوراثي للموقع 4-	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية				
النمط الوراثي AA	23	43.40%	138	59.48%	4.54	0.03	0.52	0.29-0.95
النمط الوراثي GG	5	9.43%	12	5.17%		*0.33		
النمط الوراثي AG	25	47.17%	82	35.35%	2.57	0.11		
المجموع	53	100.00%	232	100.00%	4.90	0.09		

الجدول (50) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 4- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.
تشير* إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر .

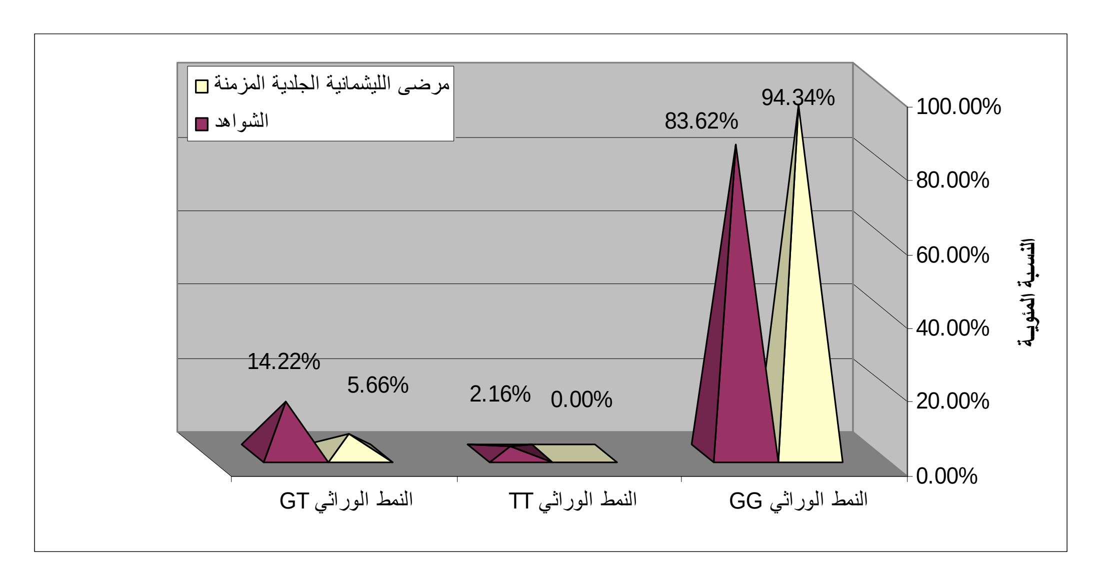


الشكل (122) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 4- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

2-6-13-4-الموقع 6424+: بدراسة توزع الأنماط الوراثية بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد في الموقع 6424+ ارتفع تواتر النمط الوراثي GG عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد P=0.045 والنتائج موضحة في الجدول التالي:

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الوراثي للموقع 6424+	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية				
النمط الوراثي GG	50	94.34%	194	83.62%	34.0	0.045	3.27	11-0.97
النمط الوراثي TT	0	0.00%	5	2.16%		*0.6		
النمط الوراثي GT	3	5.66%	33	14.22%	2.87	0.09		
المجموع	53	100.00%	232	100.00%	4.23	0.12		

الجدول (51) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 6424+ بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد، تشير* إلى أن P حسبت باستخدام اختبار التصحيح لفشر .



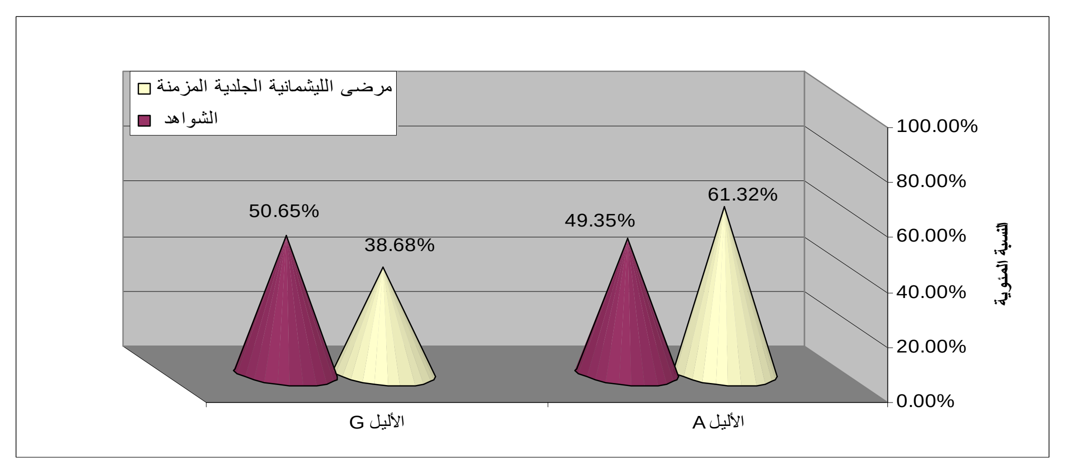
الشكل (123) مقارنة تواتر الأنماط الوراثية في الموقع 6424+ بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

2-6-14-مقارنة تواتر الآلائل للمواقع (6424+،4-،602-،986-) من مورثة الفيكولين 2 بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد:

2-6-14-1-الموقع 986-: ارتفع تواتر الأليل A الذي يرمز في هذا الموقع لمستوى عالي من بروتين الفيكولين2 عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد (χ^2 =4.95 و P=0.026،OR=1.63،CI 95%=1.06-2.50) كما يظهر الجدول التالي:

CI 95%	OR	P	χ^2	الشواهد		مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		
				النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع 986-
1.06-2.5	1.63	0.026	4.95	49.35%	229	61.32%	65	الأليل A
				50.65%	235	38.68%	41	الأليل G
				100.00%	464	100.00%	106	المجموع

الجدول (52) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد.

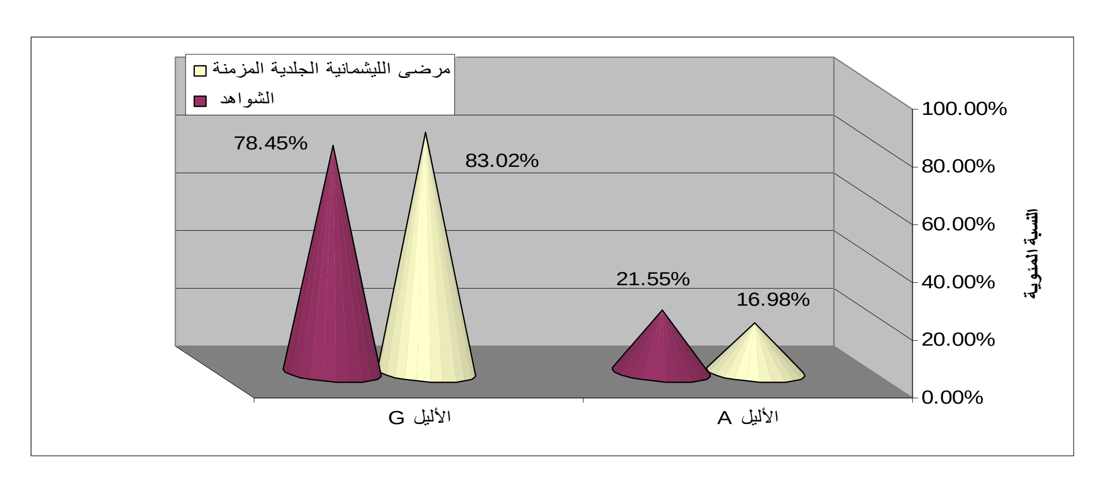


الشكل (124) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 986- بين مرضى الليشمانية الجلديةالمزمنة و الشواهد.

2-6-14-2-الموقع 602-: فيما يتعلق بهذا الموقع لم نجد فروق هامة إحصائيا بتواتر الأليلين A,G بين المرضى المزمنين والشواهد كما يوضح الجدول التالي:

P	χ^2	الشواهد		مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		
		النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع 602-
0.29	1.1	21.55%	100	16.98%	18	الأليل A
		78.45%	364	83.02%	88	الأليل G
		100.00%	464	100.00%	106	المجموع

الجدول (53) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 602- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد.

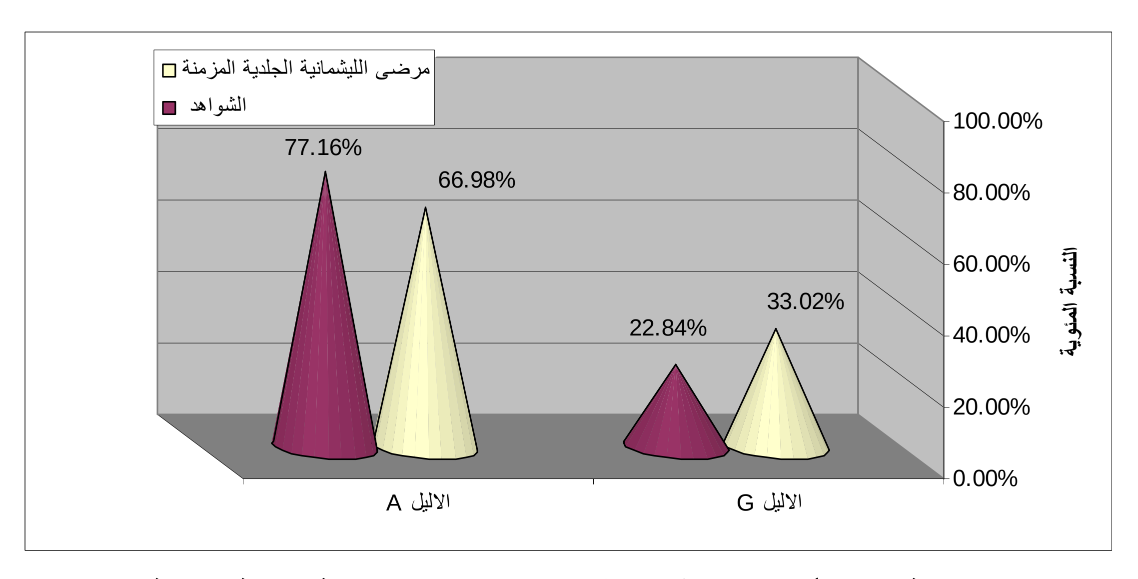


الشكل (125) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 602- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد .

2-6-14-3-الموقع 4-: ارتفع تواتر الأليل G الذي يترافق في هذا الموقع مع ارتفاع مستوى بروتين الفيكولين2 في الدم عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد (χ^2 =4.8 وP=0.029،OR=1.66،CI95%=1.02-2.69):والنتائج موضحة في الجدول التالي:

CI 95%	OR	P	χ^2	الشواهد		مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		
				النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	الأليل في الموقع 4-
-1.02 2.69	1.66	0.029	4.8	22.84%	106	33.02%	35	الأليل G
				77.16%	358	66.98%	71	الأليل A
				100.00%	464	100.00%	106	المجموع

الجدول (54) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 4- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد

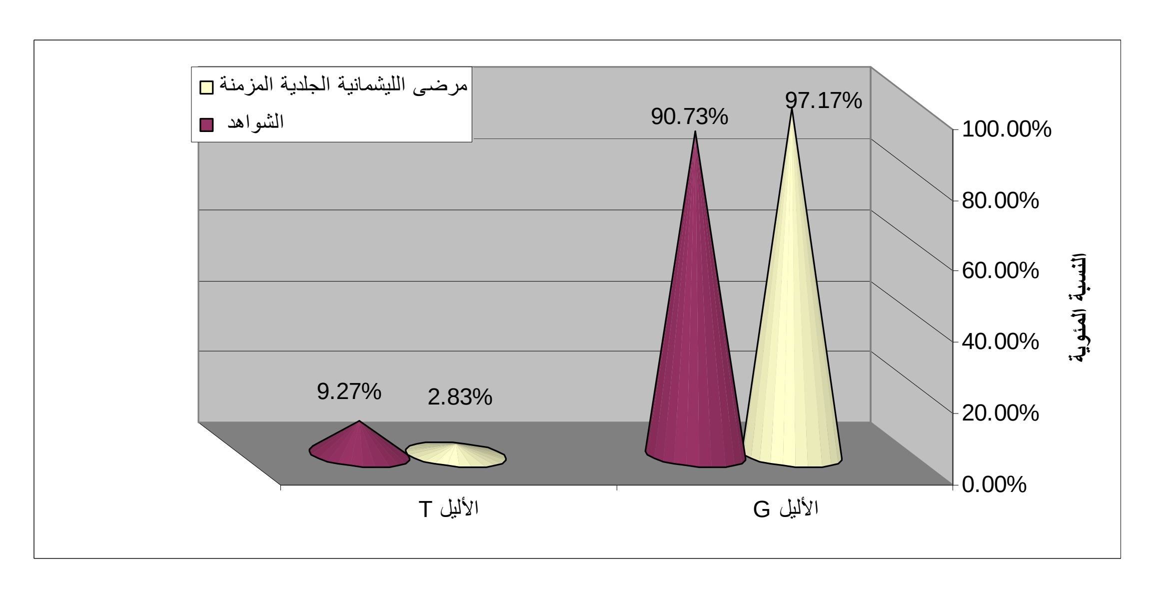


الشكل (126) مقارنة تواتر الأليلين A,G في الموقع 4- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد.

2-6-14-4-الموقع6424+: ارتفع تواتر الأليل G المترافق مع تركيز عالي للفيكولين 2 في الدم عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد (χ^2 =4.82 وP=0.028، OR=3.51، CI 95%=1.07-11.53) والنتائج موضحة في الجدول التالي:

الأليل في الموقع +6424	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة العدد	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة النسبة المئوية	الشواهد العدد	الشواهد النسبة المئوية	χ^2	P	OR	CI 95%
الأليل G	103	97.17%	421	90.73%	4.82	0.028	3.51	1.07-11.53
الأليل T	3	2.83%	43	9.27%				
المجموع	106	100.00%	464	100.00%				

الجدول (55) مقارنة تواتر الأليلين T,G في الموقع 6424+ بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد.



الشكل (127) مقارنة تواتر الأليلين T,G في الموقع 6424+ بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة و الشواهد .

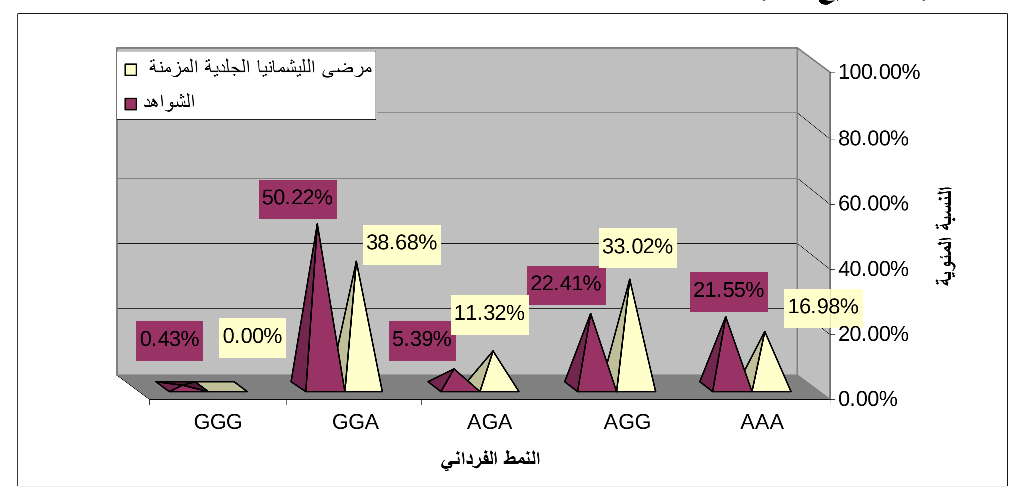
2-6-15-مقارنة تواتر الأنماط الفردانية بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد:

2-6-15-1- مقارنة تواتر الأنماط الفردانية للمواقع 4- ,602- ,986- الموجودة في منطقة المعزاز بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد:

حسبت الأنماط الفردانية للمواقع الثلاثة الموجودة في منطقة المعزاز عند مجموعة مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة وقورنت مع مجموعة الشاهد والجدول التالي يوضح هذه النتائج بالتفصيل:

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الفرداني	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية				
AAA	18	16.98	100	21.55%	1.01	0.29	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AGG	35	33.02%	104	22.41%	5.26	0.022	1.71	1.04-2.76
AGA	12	11.32%	25	5.39%	5	0.025	2.24	0.99-4.82
GGA	41	38.68%	233	50.22%	4.64	0.032	0.63	0.4-0.98
GGG	0	0.00%	2	0.43%		*1	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
المجموع	106	100.00%	464	100%	12.38	0.015	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق

الجدول (56) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 4- ,602- ,986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد ،تعني الـ OR نسبة الأرجحية للنمط الفرداني الحالي بالنسبة للبقية، * تعني أن P حسبت بواسطة اختبار التصحيح لفشر.



الشكل (128) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 4- ,602- ,986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

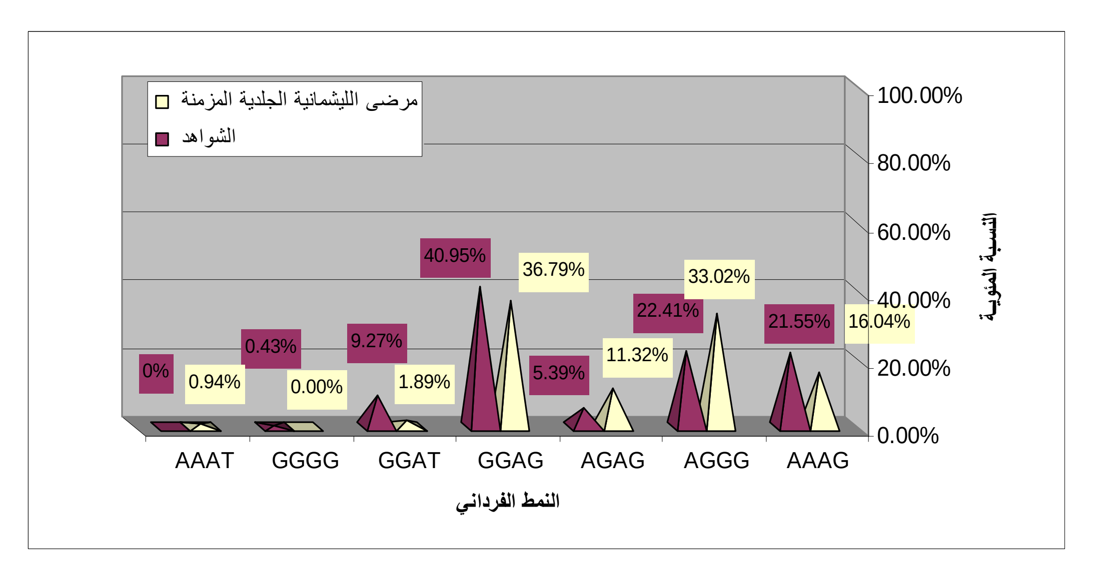
بدراسة النتائج المتعلقة بحالات الإزمان فقد اختلف توزع الأنماط الفردانية للمواقع ,602- ,986- 4- بين حالات الإزمان والشواهد P=0.015 وارتفع النمط الفرداني AGG الذي يترافق مع مستوى عال من البروتين في الدم عند المرضى إذ بلغ 33.02% بالمقارنة مع 22.41% عند الشواهد P=0.022 ونسبة الأرجحية OR=1.71 وفاصلة ثقة CI95%=1.04-2.76 (الجدول 56)، وعلى النقيض فقد انخفض النمط الفرداني GGA الذي يرمز لمستوى منخفض من البروتين في الدم عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد (38.68% للمرضى بالمقارنة مع 50.22% للشواهد P=0.032 ونسبة أرجحية OR=0.63 وفاصلة ثقة (CI95%=0.4-0.98)، بالإضافة لارتفاع نسبة النمط الفرداني AGA الذي يترافق مع مستوى طبيعي من بروتين الفيكولين في الدم عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد 11.32% مقارنة مع 5.39% ،P=0.025، OR=2.24، CI95%=0.99-4.82 (الجدول 57).

2-6-15-1- مقارنة تواتر الأنماط الفردانية للمواقع 6424+,4- ,602- ,986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد:

وفي المرحلة التالية أضفنا الموقع الرابع 6424+ للمواقع الثلاثة السابقة في حساب الأنماط الفردانية وأجرينا مقارنة بين توزع هذه الأنماط وتواتراتها بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد والجدول التالي يوضح هذه النتائج:

	مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة		الشواهد		χ^2	P	OR	CI 95%
النمط الفرداني	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية				
AAAG	17	16.04%	100	21.55%	1.61	0.2	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AGGG	35	33.02%	104	22.41%	5.26	0.022	1.71	1.04-2.76
AGAG	12	11.32%	25	5.39%	5	0.025	2.24	0.99-4.82
GGAG	39	36.79%	190	40.95%	0.62	0.43	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
GGAT	2	1.89%	43	9.27%	6.46	0.011	0.19	0.04-0.79
GGGG	0	0.00%	2	0.43%	غير قابلة للتطبيق	*1	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
AAAT	1	0.94%	0	0%	غير قابلة للتطبيق	*0.19	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق
المجموع	106	100%	464	100%	21.1	0.0018	غير قابلة للتطبيق	غير قابلة للتطبيق

الجدول (57) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 4624, 4- ,602- ,986- بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد، تعني الـ OR نسبة الأرجحية للنمط الفرداني الحالي بالنسبة للبقية ،* تعني أن P حسبت بواسطة اختبار التصحيح لفشر.



الشكل (129) مقارنة توزع الأنماط الفردانية للمواقع 6424+,4- ,602- ,986– بين مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة والشواهد.

إذا بعد إضافة الموقع 6424+للمواقع السابقة لم تتغير النتائج فقد بقي الفرق بتوزع الأنماط الفردانية بين مجموعة الإزمان ومجموعة الشواهد موجودا P=0.0018 وبقي النمط الفرداني AGGG المرمز لمستوى عال من البروتين مرتفعا عند المرضى إذ بلغ 33.02% بالمقارنة مع 22.41% عند الشواهد P=0.022 ونسبة الأرجحية OR=1.71 وفاصلة ثقة تراوحت بين CI95%=1.04-2.76، وكذلك الحال بقي النمط الفرداني GGAT الذي يرمز لمستوى منخفض منخفضا عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد 1.89% عند المرضى المزمنين مقابل.9.27% للشواهد P=0.011 ونسبة الأرجحية OR=0.19 وفاصلة ثقة CI95% =0.79 -0.04، بالإضافة لاستمرار ارتفاع نسبة النمط الفرداني AGAG الذي يترافق مع مستوى طبيعي من بروتين الفيكولين في الدم عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد (11.32% مقارنة مع 5.39% ،P=0.025،OR=2.24،CI95%=0.99-4.82).

7-2-المناقشة Discussion:

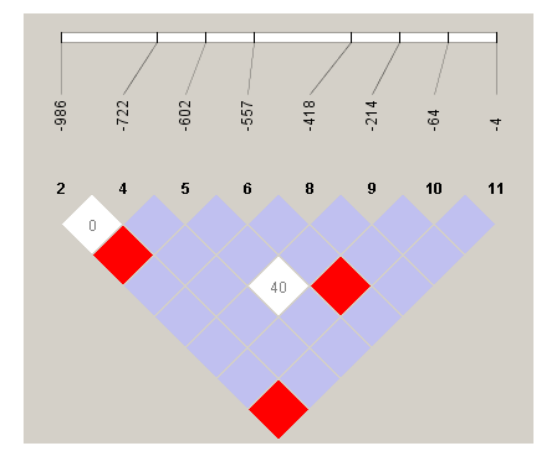
في دراستنا هذه درسنا التعدد الشكلي لجينة الفيكولين 2 عند مجموعة من مرضى الليشمانية الجلدية ومجموعة من الأصحاء وذلك في مواقع وظيفية أربعة: ثلاثة منها في منطقة المعزاز (rs3124952،rs3124953،rs17514136) والرابع في الاكزون الثامن (rs7851696). تمكنا بواسطة التفاعل السلسلي البوليميرازي ومن ثم تحديد التسلسل النوكليوتيدي على 40 عينة من الشواهد من كشف تسعة مواقع تبدل نوكليوتيدي وحيد (SNP) جديدة سبق وأشرنا إليها في النتائج (الجدول 13)، ولدى مقارنة نتائج تحليل التسلسل النوكليوتيدي لمنطقة المعزاز على عينات من دولة القابون في أفريقيا كانت قد أجريت في نفس المعهد التي أجريت فيه هذه الدراسة (223)، وجد أن هناك مواقع للتبدل النوكليوتيدي الوحيد موجودة فقط عند السوريين وغير موجودة عند الأفارقة (722-،418-) والعكس صحيح حيث لم نجد المتغيرات التالية (989-،959-،493-) الموجودة عند الأفارقة في دراستنا (الجدول 58).

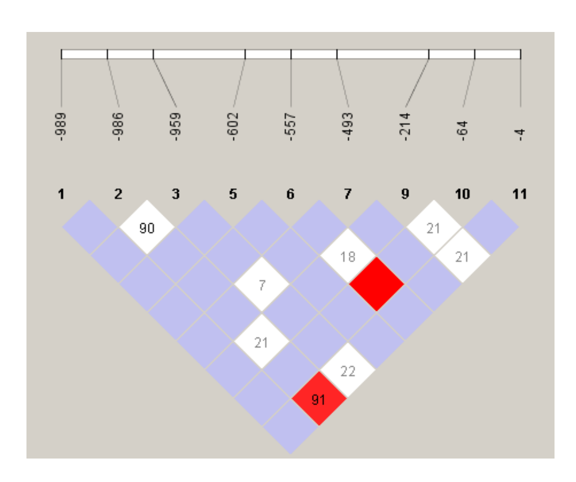
الموقع	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	دراستنا		الدراسة الافريقية	
			تواتر الأليل الأكبر	تواترالأليل الأصغر	تواترالأليل الأكبر	تواترالأليل الأصغر
-989	G	A	1	0	0.99	0.01
-986	G	A	0.5	0.5	0.81	0.19
-959	G	A	1	0	0.98	0.02
-722	C	T	0.99	0.01	1	0
-602	G	A	0.71	0.29	0.99	0.01
-557	A	G	0.89	0.11	0.81	0.19
-493	G	A	1	0	0.9	0.1
-418	G	A	0.99	0.01	1	0
-214	G	A	0.97	0.03	0.98	0.02
-64	A	C	0.86	0.14	0.82	0.18
-4	A	G	0.81	0.19	0.82	0.18

الجدول (58) مقارنة تواتر الآلائل في منطقة المعزاز بين دراستنا والدراسة الإفريقية.

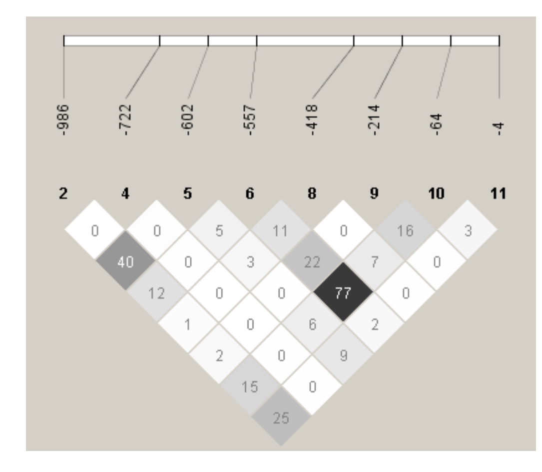
وجدنا في دراستنا أيضا توليفة أليلية قوية بين الموقعين (557-،64-) والموقعين (602-،986-) وبدرجة أقل (4-،986-)، بينما في التجمهرة الافريقية وجدت توليفة بين (64-،557-) وبدرجة أقل بين (4-,986-) (المربعات الحمراء في الشكل 130) حيث بلغ معامل الارتباط بين المواقع السابقة في دراستنا 0.77، 0.4، 0.25 على التوالي مقابل 0.92 و 0.84 على التوالي في الدراسة الافريقية (المربعات السوداء في الشكل131) إذ لم تجد ارتباطا بين (602-،986-)

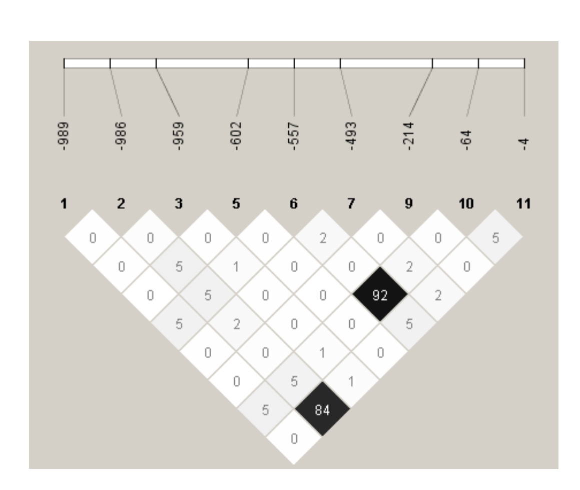
عكس دراستنا، بينما وجدت احتمالات عالية للتأشب بين بعض المواقع في الدراسة الافريقية (المربعات البيضاء في الشكل 132) الأمر الذي لم نجده في دراستنا.



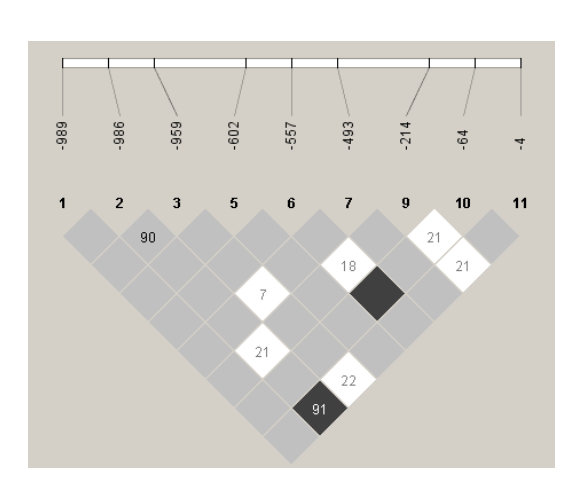


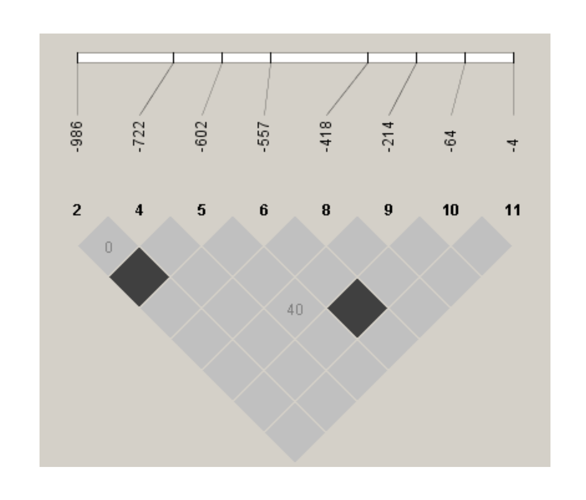
الشكل (130) مخطط الـ Haploview على اليمين دراستنا وعلى اليسار الدراسة الافريقية.
يظهر المخطط مقارنة الـ (LD) لمنطقة المحفز من مورثة الـ FCN2 بين الدراستين، تشير المربعات الحمراء إلى درجة عالية من الارتباط ،و تشير المربعات الزرقاء إلى درجة متوسطة من الارتباط، بينما تشير المربعات البيضاء إلى درجة منخفضة جدا من الارتباط.





الشكل (131) مخطط الـ Haploview على اليمين دراستنا وعلى اليسار الدراسة الافريقية، يظهر هذا المخطط قيمة معامل الارتباط r^2 بين المواقع المدروسة معبرا عنها بشكل نسبة مئوية وبتدريجات اللون من الأبيض إلى الأسود.





الشكل (132) مخطط الـ Haploview على اليمين دراستنا وعلى اليسار الدراسة الافريقية، يوضح المخطط الارتباطات الموثوقة بين المواقع حيث يشير اللون الأسود أو الرمادي الغامق إلى الدليل القوي على LD بينما يصعب تفسير اللون الرمادي الفاتح أما اللون الأبيض فيشير إلى التأشب.

الدراسة الافريقية			دراستنا				
r^2	LOD	D'	r^2	LOD	D'	L2	L1
0	0.09	1	-	-	-	**-986**	**-989**
0	0.02	1	-	-	-	**-959**	**-989**
0	0.01	1	-	-	-	**-602**	**-989**
0.05	0.42	1	-	-	-	**-557**	**-989**
0	0.04	1	-	-	-	**-493**	**-989**
0	0.01	1	-	-	-	**-214**	**-989**
0.06	0.45	1	-	-	-	**-64**	**-989**
0	0.09	1	-	-	-	**-4**	**-989**
-	-	-	0	0	0	**-722**	**-986**
0.01	0.06	0.9	-	-	-	**-959**	**-986**
0.06	0.45	1	0.4	5.99	1	**-602**	**-986**
0.05	0.98	1	0.12	1.11	1	**-557**	**-986**
0.02	0.44	1	-	-	-	**-493**	**-986**
-	-	-	0.01	0.01	1	**-418**	**-986**
0.01	0.03	0.22	0.03	0.29	1	**-214**	**-986**
0.05	0.87	1	0.16	1.76	1	**-64**	**-986**
0.84	9.49	0.92	0.25	2.8	1	**-4**	**-986**
0	0.02	1	-	-	-	**-602**	**-959**
0.01	0.09	1	-	-	-	**-557**	**-959**
0	0.02	0.07	-	-	-	**-493**	**-959**
0	0.04	1	-	-	-	**-214**	**-959**
0.01	0.36	1	-	-	-	**-64**	**-959**

		دراستنا			الدراسة الافريقية		
L1	**L2**	**D'**	**LOD**	**r^2**	**D'**	**LOD**	**r^2**
-959	**-4**	-	-	-	0.23	0.07	0.01
-722	**-602**	1	0.15	0.01	-	-	-
-722	**-557**	1	0.05	0	-	-	-
-722	**-418**	1	0.01	0	-	-	-
-722	**-214**	1	0.01	0	-	-	-
-722	**-64**	1	0.07	0	-	-	-
-722	**-4**	1	0.09	0	-	-	-
-602	**-557**	1	0.41	0.05	1	0.09	0
-602	**-493**	-	-	-	1	0.04	0
-602	**-418**	1	0.26	0.03	-	-	-
-602	**-214**	0.4	0.01	0	1	0.01	0
-602	**-64**	1	0.83	0.06	1	0.09	0
-602	**-4**	1	1.85	0.09	1	0.09	0
-557	**-493**	-	-	-	1	0.2	0.03
-557	**-418**	1	0.68	0.11	-	-	-
-557	**-214**	1	1.41	0.23	0.19	0.02	0
-557	**-64**	1	6.33	0.77	1	11.41	0.92
-557	**-4**	1	0.14	0.03	1	0.68	0.05
-493	**-214**	-	-	-	1	0.09	0
-493	**-64**	-	-	-	1	0.14	0.02
-493	**-4**	-	-	-	1	0.44	0.02
-418	**-214**	1	0.01	0	-	-	-
-418	**-64**	1	0.57	0.08	-	-	-
-418	**-4**	1	0.09	0	-	-	-
-214	**-64**	1	1.17	0.16	0.22	0.03	0.01
-214	**-4**	1	0.19	0.01	0.22	0.03	0.01
-64	**-4**	1	0.21	0.04	1	0.87	0.05

الجدول (59) يظهر مقارنة قيم (r^2،LOD،D') بين مواقع في منطقة المعزاز من مورثة الفيكولين 2 في دراستنا و الدراسة الافريقية.

إذا فقد أظهرت المجموعة السورية بعض التعددات الشكلية المختلفة عن تلك الموجودة في المجموعة الافريقية وهذا غير مستهجن بما أن الجمهرتين الجينيتين من أصول وأعراق مختلفة وكذلك الحال من مناطق جغرافية مختلفة.

ولدى مقارنة دراستنا مع دراسة أخرى أجريت في الدانمرك شملت منطقة المعزاز و كامل المناطق المترجمة من مورثة الفيكولين 2، تماثلت بعض الـ SNP بتواترها بين مجموعتنا وبعض المجموعات المدروسة واختلفت عن بعضها الآخر (الجدول 60) وهذا يؤكد أن المتغيرات في جينة الفيكولين2 تختلف باختلاف المناطق الجغرافية (198).

الموقع	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـSNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني	الدانمرك *n=60*	الموزامبيق *n=50*	غانا *n=50*	اليابان *n=50*	الأرجنتين *n=50*	دراستنا *N=40*
						تواتر الأليل الأصغر					
−1249	C	A	ss76901556	Promoter		0	0.13	0.13	0	0	0
−1232	T	C	ss76901557	Promoter		0	0.01	0	0	0.02	0
−1012	A	G	ss76901558	Promoter		0	0.01	0.01	0	0	0
−1004	C	A	ss76901559	Promoter		0	0	0.01	0	0	0
−986	G	A	rs3124952	Promoter		0.49	0.24	0.2	0.12	0.45	0.50
−959	G	A	ss76901560	Promoter		0	0.05	0	0	0	0
−902	C	A	rs3811143	Promoter		0	0.02	0	0.12	0.02	0
−602	G	A	rs3124953	Promoter		0.2	0.02	0	0.1	0.22	0.29
−557	A	G	rs3811140	Promoter		0.11	0.18	0.31	0.14	0.17	0.11
−251	G	A	ss76901561	Promoter		0	0.13	0.12	0	0	0
−214	G	A	rs12344051	Promoter		0	0.05	0.06	0	0	0.03
−171	C	T	rs3811139	Promoter		0	0	0	0.06	0	0
−64	A	C	rs28969369	Promoter		0.06	0.22	0.32	0.15	0.16	0.14
−4	A	G	rs17514136	Promoter		0.24	0.22	0.2	0.04	0.2	0.2
33	C	T	ss76901562	Exon 1	Gly11Gly	0	0.1	0.08	0	0	0

الموقع	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـSNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني	الدانمرك *n=60*	الموزامبيق *n=50*	غانا *n=50*	اليابان *n=50*	الأرجنتين *n=50*	دراستنا *N=40*
						تواتر الأليل الأصغر					
125	T	C	rs3128627	Intron 1		0.08	0	0	0.01	0	0
1766	G	A	ss76901563	Exon 2	Gly54Gly	0	0.07	0.04	0	0	0
1878	T	C	rs3124955	Intron 2		0.33	0.18	0.17	0.45	0.21	0.38
2472	A	G	rs3128624	Intron 2		0.34	0.3	0.31	0.46	0.21	0.37
2488	T	C	rs4520243	Exon 3	Arg74Arg	0.37	0.3	0.31	0.47	0.21	0.38
2545	G	A	rs7037264	Intron 3		0.43	0.71	0.74	0.45	0.57	0.37
3980	C	T	ss76901564	Intron 4		0	0	0.02	0	0	0
4423	C	T	ss76901565	Exon 5	Arg103Cys	0	0.01	0	0	0	0
4466	G	A	rs12684476	Exon 5	Gly117Ser	0	0	0	0.08	0	0
4526	C	T	ss76901566	Exon 5	Thr137Met	0	0.01	0.01	0	0	0
4588	G	A	ss76901568	Intron 5		0	0.06	0.04	0	0	0
4888	C	T	ss76901569	Intron 5		0	0.01	0.01	0	0	0.01
4957	G	A	ss76901570	Exon 6	Arg147Gln	0	0.01	0	0	0	0
4987	G	A	ss76901571	Exon 6	Arg157Gln	0	0	0	0.01	0	0
5060	C	T	rs34789496	Exon 6	His181His	0.03	0	0.01	0.14	0.19	0
5070	G	A	ss76901572	Exon 6	Ala185Thr	0	0	0	0.01	0	0
5121	G	A	rs12684723	Intron 6		0.13	0.16	0.24	0.15	0.17	0
6359	C	T	rs17549193	Exon 8	Thr236Met	0.25	0.45	0.37	0.04	0.22	0.19

الموقع	الأليل الأكبر	الأليل الأصغر	رقم تنصيب الـSNP	المنطقة	تغير الحمض الأميني	الدانمرك n=60	الموزامبيق n=50	غانا n=50	اليابان n=50	الأرجنتين n=50	دراستنا N=40
						تواتر الأليل الأصغر					
6424	G	T	rs7851696	Exon 8	Ala258Ser	0.1	0.17	0.25	0.14	0.18	0.05
6459	C	T	ss76901573	Exon 8	Asn269Asn	0	0.02	0.02	0	0	0
+6443_44	CT	A	rs28357091	Exon 8	Ala264fs	0.01	0	0	0	0	0

الجدول (60) مقارنة الـ SNP وتواتراتها بين دراستنا والدراسة الدانماركية.

يتبين من الجدول السابق أن تواترات الـ SNPs في المجموعة العربية أكثر ما تشابه مثيلاتها في المجموعة الدانماركية ماعدا الموقع 64- إذ بلغ تواتر الأليل الأصغر 0.14 في دراستنا مقابل 0.06 في المجموعة الدانماركية.

إن هذه الدراسة هي الأولى من نوعها التي درست التعدد الشكلي في جينة الفيكولين 2 في العالم العربي، وكذلك الأمر الأولى التي درست العلاقة بين هذه المورثة والبروتين التي ترمز له وأحد أكثر الأمراض توطنا في بلادنا، إذ أنه في سوريا تتواجد الليشمانية الحشوية بأعداد قليلة بعكس الليشمانية الجلدية التي تتواجد بأعداد كبيرة حتى أنها يمكن أن تزداد بأي وقت ولأجل هذه المسببات ركزنا في هذه الدراسة على الليشمانية الجلدية.

أما عالميا فعلى الرغم من التقدم الكبير الذي تم إحرازه منذ وصف العالمين (William Leishman وCharles Donovan) الليشمانية كعامل ممرض جديد سنة 1901-1903، وذلك قبل أن يثبت Ronald Ross علاقته بالمرض ويطلق عليه اسم Leishmania Donovani حتى الآن ما يزال الغموض يلف الجانب الأكبر من الإمراضية والمناعة في هذا المرض.

فمن المعروف أن محصول المرض يتحدد عبر المكونات (العناصر) الثلاثة التي تحكم العلاقة بين المضيف والطفيلي وهذه المكونات هي: الأرضية الجينية للثوي، الاستجابة المناعية، وكذلك القدرة الممرضة للطفيلي (224،23)، أجريت الكثير من الدراسات عن تأثير السلالات الطفيلية بينما قلة درست العوامل المتعلقة بالثوي.

آخذين بعين الاعتبار الفيزيولوجيا المرضية لخمج الليشمانية، يبدو أن الاستعداد (القابلية) للإصابة يعتمد إلى حد ما على الآلية المبكرة التي تتدخل بالتآثر بين البالعات والطفيلي (221)،

وأن الصيغة الوراثية التي تقود إلى تفعيل البالعات وتفعيل مجموعات من الخلايا التائية يساهم في الاستعداد للمرض (23)، حيث تشكل البالعات ووحيدات النوى المكان الخلوي للطفيلي وبالنتيجة، فإن البلعمة هي خطوة ضرورية للإصابة بالليشمانية والتي تشمل كلا العاملين (العامل الممرض بالإضافة للعوامل التي تتعلق بالمضيف كالطاهيات).

الفيكولين 2 والبروتين الرابط للمانوزمن العوامل الطاهية التي ترتبط إلى سطح عوامل ممرضة مختلفة وتتفاعل مع نفس الجزيئات التي سيتم إدخالها للبالعات (226،225)، فبينما تم إثبات ارتباط الـ MBL بسطح الليشمانية ونتيجة لذلك تسهيل دخولها إلى البالعات (227،228) لم تستطع الدراسات المختلفة إظهار ارتباط الفيكولين 2 على سطح الليشمانية بسبب صعوبات تقنية وصعوبات في الطرائق.

بالإضافة إلى ذلك فقد أظهرت الاستقصاءات الكيميائية الحيوية أن الـ MBL الذي يرتبط بالأشكال أمامية السوط لليشمانية يمكن أن يشكل آلية قبط جديدة للطفيلي من قبل البالعات (228،227)، والذي انعكس بالارتباط الجيني بين الأنماط الفردانية التي ترمز لمستوى عالي من البروتين MBL في الدم المحيطي والإصابة بالليشمانية الحشوية حيث ارتبط المستوى العالي منه مباشرة بتطور ليشمانية حشوية لدى الاصابة بالليشمانية الشاغاسية (229)، وكذلك الأمر انعكس هذا الارتباط بين الأنماط الوراثية التي ترمز لمستوى عالي منه والإصابة بالليشمانية الطفلية (230)، بناء عليه فالأشخاص الذين لديهم عوز في البروتين الرابط للمانوز لديهم حماية ضد دخول الليشمانية إلى خلايا الثوي وفعله هنا كفعل التعدد الشكلي للـ MBL في العديد من الأمراض الخمجية الجرثومية (232،231).

الفيكولين من الجزيئات الهامة في تمييز وتصفية العوامل الممرضة خلال المرحلة الأولى والمراحل المتعاقبة من الدفاع المناعي، وقد أثبت أن الفيكولين 2 يميز عوامل ممرضة مختلفة هامة سريريا تتضمن الجراثيم ايجابية الغرام مؤديا إلى تفعيل المتممة عبر سبيل اللكتين وعند ارتباطه باللجين المناسب من السكريات أو عديدات السكريات على السطوح الحرثومية، كما ويتصرف كطاهيا بتواسطه تحطمها بالبلعمة، هناك الكثير من الجزيئات المرافقة للعوامل الممرضة كثيرة والتي يستطيع الفيكولين تمييزها منها الليبو تيكويك أسيد، البيبتيدوغليكان وعديدات السكريد وهكذا وبما أن للفيكولينات فعل مشابه كالـ MBL فمن الممكن أن يكون للفيكولين 2 دورا بيولوجيا هاما في تفاعل الليشمانية مع المضيف وهذا بحد ذاته له دور بالصورة السريرية للمرض.

فبينما لم نجد فروق بتكرارات الآلائل بين مجموعتي المرضى والشواهد، وجدنا ارتفاع النمط الوراثي TT عند الشواهد، كما وجدنا اختلافات عديدة بين مرضى الليشمانية المزمنة والشواهد: فقد ارتفع تواتر الأليل A في الموقع 986- والأليل G في الموقع4- وكذلك الأليل G في الموقع 6424+ هذه الآلائل التي ترفع تركيز الفيكولين 2 (152،203) في الدم ارتفعت تواتراتها عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد، بالإضافة لارتفاع النمط الوراثي AA في الموقع 986- وانخفاضه في الموقع4-،وارتفاع تواتر النمط الوراثي GG في الموقع 6424+ عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد هذه الأنماط التي أثبتت علاقتها مع ارتفاع التركيز المصلي لبروتين الفيكولين 2 في المصل (152،203)، كل هذه النتائج تتماشى مع الدور السلبي لهذا البروتين في الإصابة بالليشمانية.

قمنا أيضا بدراسة توزع الأنماط الفردانية كونها تؤثر على المستوى المصلي لهذا البروتين (203)، فوجدنا ارتفاع النمطان AGAG،AGA اللذان يرمزان للمستوى الطبيعي من بروتين الفيكولين عند المرضى بالمقارنة مع الشواهد، وكذلك الحال ارتفع النمطان الفردانيان AGGG،AGG اللذان يرمزان لمستوى عال من الفيكولين 2 عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد، بينما انخفض النمطان الفردانيان GGAT،GGA اللذان يرمزان لمستوى منخفض من الفيكولين 2 في الدم عند المرضى المزمنين بالمقارنة مع الشواهد.

هكذا فإن انخفاض الفيكولين 2 يمكن أن يكون له دور مفيد في الحماية من الليشمانية الجلدية وذلك كما يفعل MBL والتعدد الشكلي في مورثته في بعض الإنتانات الجرثومية (231،232)، فالمستويات العالية من الفيكولين2 تزيد الاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية المزمنة، بينما تمثل المستويات المنخفضة عامل حماية من هذا الشكل، يبدو أن القوى الانتقائية selective forces قد قامت بدور مماثل لما قامت به المتصورات النشيطة التي ساعدت على وجود الخضاب المنجلي في أفريقيا بنسبة عالية (233)، قامت هنا في حالة الليشمانية الجلدية بضغط انتقائي إيجابي على الأنماط الفردانية لمورثة الفيكولين 2 وهذا يلعب دورا واقيا ضد المرض.

هكذا يبدو أن للفيكولين 2 دوران متعاكسان في سيرورة الأمراض الانتانية، فبينما ارتبط عوز الفيكولين 2 مع الانتانات التنفسية المتكررة التي قد تترافق أو تتزامن مع اضطرابات تأتبية عند الأطفال (163،205)، وكذلك الحال مع الخداج وانخفاض وزن الولادة والانتانات ماحول الولادة (208)، كما لعب الفيكولين 2 دورا واقيا في الاستعداد للإصابة بالجذام حيث انخفض النمط الفرداني AGAG للمواقع6424+/4-/602-/986- الذي يترافق مع المستوى الطبيعي من الفيكولين في الدم على التوالي عند مرضى الجذام (211)، كما مثل الفيكولين 2 عاملا واقيا ضد

الإصابة بحمى الروماتزم وضد تطور حمى الروماتزم (الرثوية) وأمراض القلب الروماتويدية المزمنة في دراسات أخرى (212)، وذلك على النقيض تماما من دراستنا إذ شكل الفيكولين 2 عامل خطورة للإصابة بالليشمانية مما يشكل دليلا جينيا على الاختلاف أو التناقض في وظيفة التعدد الشكلي للفيكولين 2 في الليشمانية الجلدية.

هكذا فإن التشابه بين البروتين الرابط للمانوز والفيكولين 2 في البنية والعمل ارتقى إلى تشابه وظيفي على مستوى الاصابة بالليشمانية فبينما ارتبط المستوى المصلي للبروتين الرابط للمانوز بإمكانية تطوير ليشمانية حشوية لدى الاصابة بالليشمانية الشاغازية وذلك بتعديل انتاج السيتوكينات من عامل نخرة الأورام ألفا والانترلوكين 6 من قبل البالعات المصابة بالليشمانية الشاغاسية، ارتبط مستوى الفيكولين 2 بالإصابة بالليشمانية الجلدية وقد يكون بنفس الآلية، من جهة أخرى تشير الدراسات إلى أن البروتين الرابط للمانوز يعدل الصورة السريرية للإصابة بالليشمانية الشاغاسية وكذلك الحال عمل البالعات المصابة، وأن النمط الجيني يمكن أن يتكهن عن خطورة تطوير إصابة بالليشمانية الحشوية والمضاعفات السريرية لليشمانية الشاغاسية (227،229).

تشير دراستنا إلى أن النمط الفرداني الوظيفي للفيكولين 2 يؤثر على الاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية كما يؤثر على تطورها السريري باتجاه الإزمان، وكما أن للبروتين الرابط للمانوز دور ثنائي ومتعاكس الذي يفسر تارة محاسنه وتارة أخرى مساوئه في العديد من الأمراض، فإن التعدد الشكلي وبالتالي المستوى المصلي للفيكولين 2 يحمي من بعض الأمراض ويؤهب لبعضها الآخر.

أخيرا تجعلنا هذه النتائج نفترض أن النمط الفرداني للشخص يتدخل في تحديد مستقبل العدوى الجلدية لطفيلي الليشمانية نحو إصابة جلدية أو لا كذلك يؤثر على تطور هذه الآفة نحو الإزمان وأن الفيكولين قد يكون عاملا إضافيا يساهم بسهولة إجتياح الليشمانية للبالعات.

على الرغم من أن دور الفيكولين 2 في التفاعل بين سطح الليشمانية وخلايا المضيف بحاجة إلى تأكيد كما سبق وأكد دوره في الارتباط بالمثقبيات الافريقية (234)، فقد كشفت هذه الدراسة عن دور لهذه الجزيئة في الليشمانية وقدمت مثالا أخر كيف تكون تغيرات شكلية ضارة ظاهريا مفيدة في جمهرة ما.

8-2-الخلاصة Conclusion:

هدف البحث إلى دراسة التعدد الشكلي في جينة الفيكولين 2 التي تتدخل في المناعة الطبيعية عبر البروتين الذي ترمز له وذلك عند مرضى أثبتت إصابتهم بالليشمانية الجلدية، والبحث عن علاقة ممكنة بين توزع الآلائل، الأنماط الوراثية، الأنماط الفردانية والإصابة بالليشمانية.

تضمنت دراسة الحالة-الشاهد هذه 235 مريضا مصابا بأشكال مختلفة من الليشمانية الجلدية، و232 شاهدا ينتمي المرضى والشواهد لنفس السوية الاجتماعية ونفس المنطقة الجغرافية.

أجريت هذه الدراسة على مرحلتين: الأولى في سوريا حيث جمعت عينات الدراسة واستخلص الـ DNA في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية في كلية الطب-جامعة دمشق، بينما أكملت المرحلة الثانية في قسم الطفيليات البشرية- معهد الطب المداري- جامعة توبنجن- ألمانيا، حيث أجريت الخطوات المتبقية وباستخدام طرق البيولوجيا الجزيئية الحديثة وهي الـ Real Time PCR على جهاز الـ Roter Gene 3000 باستخدام مسبار الـ TaqMan وهي من الطرق الحديثة والسريعة لكشف التعدد الشكلي في المورثات، كما استخدمت تقانة تحديد التتابع النوكليوتيدي DNA sequencing على جهاز3100 sequencer analyzer ويتم البدء بهذه التقانة بإجراء PCR باستخدام مشرعات الخاصة بكل اكزون ثم ترحيل نواتج الـ PCR ومن بعدها تنقية هذه المنتجات وبعد هذه المرحلة يجرى التأكد من جودتها وذلك بالترحيل على جيل الآغاروز و قياس تركيز الـ DNA قبل إجراء الـ Cycle sequencing وهي عبارة عن تفاعل سلسلي بوليميرازي خاص تستخدم فيه نوكليوتيدات معلمة بالفلور ddNTP's بالإضافة للنوكليوتيدات الطبيعية dNTP's بوجود إحدى المشرعتين ليجرى بعدها كخطوة أخيرة تنقية لنواتج التفاعل قبل إدخال العينات على جهاز الـ Sequencer وبعد الحصول على النتائج يتم تحليلها بواسطة برنامج Bio Edit .

تم تعيين عدة مناطق SNP جديدة وذلك من خلال تحديد التسلسل النوكليوتيدي لمنطقة محفز النسخ ولكامل المناطق المترجمة من المورثة وعددها ثمانية إكزونات عند 40 عينة من عينات الشواهد: اثنين من هذه التغيرات تؤدي إلى تغيرات في الحموض الأمينية المرمزة لها: الأول في الاكزون 6 (+4986C>T) والذي يؤدي إلى تغيير الحمض الأميني 157 من أرجنين Arg إلى تريبتوفان Trp، والتعدد الشكلي الثاني وقع في الاكزون الثامن (+6584G>A) مؤديا إلى تغيير الحمض الأميني في الموقع 311 من أرجنين إلى غليسين.

في دراسة هذه قمنا بتحليل الـ SNPs الوظيفية في منطقة المعزاز والاكزون الثامن والمعروف عنها بتأثيرها على المستوى المصلي للفيكولين 2، لم نجد فرقا بتوزع الـ SNPs في المناطق

(rs3124952، rs3124953، rs17514136) الموجـودة بمنطقـة المعـزاز بـين المرضـى والشواهد. بينما وبالنظر للتعدد الشكلي في الاكزون الثامن (rs7851696) وجدنا فرق ذو مغزى إحصائي في الأنماط الوراثية بين المرضى والشواهد إذ وجد 5 أشخاص متوافقي اللواقح TT بين عينات الشواهد وعددها 232 والذي ينتج عنه الحمض الأميني سيرين بدل الآلانين في الموقع 258 مؤديا لانخفاض المستوى المصلي للبروتين الناتج ولم نجد ولا حالة عند مجموعة المرضى وعددها 235.

كما قمنا بدراسة الأنماط الفردانية حيث حسبت هذه الأنماط وتواتراتها باستخدام برنامج Arlequin وثم باستخدام برنامج الـ Stata قمنا بمقارنة تواترت الأنماط الفردانية بين مجموعة المرضى والشواهد فوجدنا ارتفاع النمطان الفردانيان AGA,AGAG المرمزان لمستوى طبيعي من الفيكولين 2 في الدم عند المرضى بالمقارنة مع الشواهد وكذلك الحال ارتفع النمطان الفردانيان AGG،AGGG اللذان يرمزان لمستوى عال من الفيكولين 2عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد، بينما انخفض النمطان الفردانيان GGA,GGAT اللذان يرمزان لمستوى منخفض من الفيكولين 2 في الدم عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد، بالإضافة لاستمرار ارتفاع النمطان AGA,AGAG عند مرضى الليشمانية الجلدية المزمنة بالمقارنة مع الشواهد، والجديد في دراسة حالات الازمان هذه هو ارتفاع تواتر الأليل A في الموقع 986- والأليل G في الموقع4- وكذلك الأليل G في الموقع 6424+ هذه الآلائل التي ترفع تركيز الفيكولين 2 في الدم بالإضافة لارتفاع النمط الوراثي AA في الموقع 986- وانخفاضه في الموقع4- وكذلك ارتفاع تواتر النمط الوراثي GG في الموقع 6424+ في حالات الإزمان وهذا يتماشى مع نتائج الآلائل والأنماط الفردانية.

هكذا فإن إنخفاض مستوى الفيكولين 2 يمكن أن يكون له دور مفيد في الحماية ضد الليشمانية وأن المستويات العالية تزيد الاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية المزمنة، بينما تمثل المستويات المنخفضة عامل حماية من هذا الشكل من الإصابة.

وبما أن الأمراض الخمجية هي القوة المحركة الرئيسية للمحافظة (بقاء واستمرار) على التعدد الشكلي للعديد من الجينات التي تؤثر على مقاومة الثوي والمثال التقليدي للقوى الانتقائية هو الملاريا المنجلية المسؤولة عن استمرار التناقض بوجود الخضاب المنجلي بتواتر عالي في أفريقيا، وكما هو الحال بالنسبة للبروتين الرابط للمانوز، فإن نتائج دراستنا تقترح إلى أن دورا مماثلا لليشمانية كقوة محركة في الانتقاء الايجابي للأنماط الفردانية المسؤولة عن المستوى المنحفض للفيكولين، قد يكون ذلك بمساعدة عوامل أخرى مجهولة قد تكون عوامل ممرضة

داخل خلوية تؤثر على التعدد الشكلي في الـفيكولين، وهذا يشكل ميزان ضد التأثيرات غير المستحبة لعوز الفيكولين كالاستعداد للانتانات التنفسية المتكررة عند الأطفال أو الإصابة بالجذام وغيرها.

هكذا يمكن أن يشكل التعدد الشكلي في جينة الفيكولين 2 مثالا أخر على التناقض يبدو أنه مشابه للخضاب المنجلي والبروتين الرابط للمانوز ومن الواضح أنه يجب اختبار صحة هذه النظرية بتنميط دنا الفيكولين 2 على مجموعات أكبر من المرضى والشواهد.

إذا قدمنا في هذه الدراسة دليلا على أن النمط الفرداني الوظيفي للفيكولين المترافق مع مستوى طبيعي من الفيكولين في الدم يزيد تأهب الشخص للإصابة بالليشمانية، والأنماط الفردانية المرمزة لمستوى عالي منه تزيد التأهب للشكل المزمن بينما تمثل الأنماط الفردانية المرمزة لمستوى منخفض منه عامل حماية ضد تطور داء الليشمانيات الجلدية باتجاه الإزمان.

وبالملخص فإن نتائج دراستنا أشارت إلى الدور الهام للتعدد الشكلي في جينة الفيكولين 2 في الاستعداد للإصابة بالليشمانية الجلدية وشكلها المزمن، وأن الفيكولين 2 قد يكون عامل إضافي يساهم باجتياح الليشمانية للبالعات.

2-9-التوصيات Recommendations:

- بسبب غياب دراسات مشابهة عن علاقة التعدد الشكلي في جينة الفيكولين2 وتطور الأشكال المختلفة من الليشمانية الجلدية لذلك يوصى بدراسات أخرى لجمهرات أخرى أكبر، كما يوصى أيضا باختبار نتائجنا في عينة بأعداد أكبر من حالات الازمان.
- دراسة وظيفية لسلوك البالعات في مواجهة طفيلي الليشمانية بوجود تراكيز مختلفة من الفيكولين 2.
- دعم التعاون الدولي والاقليمي للمزيد من الأبحاث الجديدة حول هذا الداء.
- تطوير استخدام التقانات الحديثة في مجال الليشمانية ووضعها موضع التطبيق.
- إجراء أبحاث معمقة عن علاقة عوامل المضيف الأخرى بالإصابة بالليشمانية.
- الأخذ بعين الاعتبار التعدد الشكلي للفيكولين 2 لدى دراسة الأليات المرضية للأمراض الخمجية والمناعية الذاتية.
- دراسة العلاقة بين مستوى الفيكولين 2 المصلي والأمراض الخمجية المختلفة.

References:

1-Cox Francis EG (1996). The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. London: The Wellcome Trust. pp. 206-217.

2-Leishmaniasis:background information. www.who.int/entity/leishmaniasis/en-WHO. Retrieved on 04-07-2007.

3-Garcia Rivas L (1993). Leishmaniasis visceral or Kala-azar. Dermatol Venezolana 31:39-46.

4-Cunningham DD (1885). On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. Scientific memoirs officers Medical Sanitary Departments Government India. Calcutta: Printed by the superintendent of government printing, India. pp. 21–31.

5-Cox FE (2002). History of human parasitology. Clin Microbiol Rev 15(4):595–612.

6-Herwaldt BL (1999). Leishmaniasis. Lancet Oct2;354(9185):1191-1199.

7-Dedet JP (2005). Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniases and other tropical diseases. Parasitologia Dec;47(3-4):291-295.

8-Ismail MT, Alkafri A (2008). Medical fungi and parasitology. Publication of Damascus University .Chapter 7;pp. 105-124.

9-World Health Organization (1984). The Leishmaniasis. Report of the WHO expert committee. technical report series 701.

10-World Health Organization (1990). Control of Leishmaniasis: Report of WHO Expert Committee. technical report series 793.

11-Balaj SS. Study of Differentiation of Cutaneous Leishmaniosis Strains in Aleppo using Antibodies (2001). Thesis submitted for Doctorate in Zoology. University of Aleppo, Faculty of Science, Syria.

12-Ashford RW (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol Nov;30(12-13):1269-1281.

13-Lipoldova M, Demant P (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nat Rev Genet 7:294-305.

14-Tulane University Vector of Protozoan Parasites.www.tulane.edu/wiser/notes Html. Retrieved on 25 May 2007.

15-Bates PA (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phleobotomine sand flies. Int J Parasitol Aug;37 (10):1097-1106.

16-Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG (2000). The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. Parasite Immunol 22:319-331.

17-Klaus SN, Frankenburg S, Dhar AD (2003). Leishmaniasis and other protozoan infections. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine. Sixth edition pp.2215-2221.

18-Paul W (1995). Infectious diseases and immune system. Scientific American Magazine 11(10):35-48.

19-Malla N, Nahajan RC (2006). Pathophsiology of visceral leishmaniasis-some recent concepts. Indian J Med Res March 123:267-274.

20-Magill A, Grögl M, Gasser RA, Wellington S, Oster CN (1993). Visceral infection caused by Leishmania tropica in veterans of operation Desert Storm. The N Engl J Med 328(19):1383-1387.

21-Baldwin TM , Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E (2003). The site of Leishmania major Infection Determine Disease Severity and Immune Responses. Infect Immun Dec;71(12):6830-6834.

22-Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Texeira R, Johnson Jr WD (1987). Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. J Infect Dis156:1030-1032.

23-Blackwell JM (1996). Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Parasitology 112 Suppl:S67–74.

24-Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A (2003). Early mechanisms of Leishmania infection in human blood. Microbes and Infection 5:507–513.

25-Navin TR, Krug EC, Pearson RD (1998). Effect of immunoglobulin M from normal human serum on Leishmania donovani promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. Infect Immun 57:1343–1346.

26-Nunes AC, Ramalho-Pinto FJ (1996). Complement resistance of Leishmania amazonensis promastigotes is independent of parasite proteases and lysis by sensitive forms is not due to natural antibodies in normal human serum. Braz J Med Biol Res 29:1633–1640.

27-Green PJ, Feizi T, Stoll M S, Thiel S, Prescott A, McConville MJ (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. Mol Biochem Parasitol 66:319–328.

28-Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T (2002). Intracellular Survival of Leishmania major in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. Infect Immun February; 70(2):826–833.

29-Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 cell in vivo: IL-12 is required to maintain memory effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. Proc Nat Acad Sci USA. 97:8427 .

30-Wnag ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM (1994). CD4 effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma –deficient mice infected with leishmania major. J Exp Med 179:1367-1371.

31-Roberts MTM (2006). Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. British Medical Bulletin 75-76:115–130.

32-Kemp M, Hey AS, Kurtzhals JA, Christensen CB, Gaafar A, Mustafa MD, Kordofani. A A, Ismail A, Kharazmi A, Theander TG (1994). Dichitomy of the human T cell response to Leishmanis antigens. I.Th1 –like response to major promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol 96:410-415.

33-Tripathi P, Singh V, Naik S (2007). Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. FEMS Immunol Med Microbiol 51:229–242.

34-Stenger S, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C (1994). Tissue expession of inducible nitric oxide synthesis is closely associated with resistance to leishmania major. J Exp Med 180 (3):783-793.

35-Brandonisio O, Panaro MA, Sisto M (2000). Interactions between Leishmania parasites and host cells. Parassitologia Dec;42(3-4):183-190.

36-Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL (2003). The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to Leishmania major. J Immunol 170:5152-5158 .

37-Alvar J, Caanavate C, Gutierrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J (1997). Leishmania and human immunodiffency virus coinfection :the first 10 years. Clin Microbiol Rev 10:298-391.

38-Alexander J, Bryson K(2005). T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. Immunology Letters 99:17-23.

39-Sadeghian G, Momeni A, Siadat AH, Usefi P (2006). Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. Dermatol Online J Dec 10;12(7):3.

40-Anders G (2003). PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies. Dissertation to obtain the academic degree medicinae doctor (MD). Medical Faculty Charité ,Humboldt-Universität, Berlin Germany.

41-Vega-Lopez F, Hay RJ (2004). Parasitic Worms and Protozoa. Rook's textbook of dermatology. Seventh edition Mar;123(3):295-310.

42-Mehregan DR, Amir H, David A (1999). Histological Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Pinkus Dermatopathology Laboratory. Elsevir,Newyork:297-304.

43-Raja KM, Khan AA, Hameed A, Rahman SB (1998)."Unusual clinical variants of cutaneous leishmaniasis as in Pakistan". Br J Dermatol Jul;139(1):111-113.

44-Uzun S, Acar MA, Uslular C, Kavukcu H, Aksungur VL, Culha G, Gurel MS, Memisoglu HR (1999). Uncommon presentation of cutaneous leishmaniasis as eczema-like eruption. J Eur Acad Dermatol Venereol 12(3):266-268.

45-Salmanpour R, Handjani F, Zerehsaz F, Ardehali S, Panjehshahin MR (1999). Erysipeloid Leishmaniasis: an unusual clinical presentation. Eur J Dermatol Sep;9(6):458-459 .

46-Desjeux P (1999). Global control and Leishmania HIV co-infection. Clinics in Dermatology 17(3):317-325.

47-Kamhawi S, Abdel-Hafez SK Arbagi A (1995). A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in northern Jordan. Trans R Soc Trop Med Hyg. May-Jun;89(3):255-257.

48-Ismail MT, Pesson B (1992). Study of phleobotomus sandflies in Syria. Bull Soc Pathol Exot 85(4):317-321.

49-Lepine P (1926). Trios cas Syriens de Kala-Azar infantile. Bulletin de la societe de pathologie exotique 19:429-431.

50-Adler S, Theodor O (1929). The distribution of sandflies and leishmaniasis in Palestine, Syria, and Mesopotamia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 23:269-306.

51-Berberian DA (1958). Problems epidemiologiques relatives a la transmission du boutons. sixteenth congress of tropical medicine and malaria, Lisbon.

52-Corradetti A (1976). Information on leishmaniasis collected in Lebanon, Syria, Iraq and Turky during September and October 1965. Geneva:World Health Organization, Mimeographed document no.WHO/LEASH/67.6

53-Abdou AH, Chehade A, Zein El-Din (1976). Past and present situation of cutaneous leishmaniasis (Aleppo boil) in Syria. Bulletin of Alexandria Faculty of Medicine12:41-49.

54-Ministry of health Health Statistical Abstract, Syrian Arab Republic (Fifth Issue)(2009).

55-Khiami A, Dereure J, Pratlong F, Martini A, Rioux JA (1991). Human Cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania Major MON-26 in the region of Damascus Syria. Bulletin Societe de Pathologie Exotic 84(4):340-344.

56-Rioux JA, Ashford RW, Khiami A (1992). Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 3 Leishmania major infection in Psammomys obesus provides clues to life history of the rodent and possible control measures. Ann Parsitol Hum Comp 67(6):163-165.

57-Dereure J, Rioux JA, Khiami A, Pratlong F, Perieres J, Martini A (1991). Ecoepidemiologie des leishmaniosis en Syrie 2– presence, chez le chien, de leishmania infantum. Ann Parasitol Hum comp 66(6):255-252.

58-Rioux JA, Le Ger N, Haddad N, Gramiccia M, Jalouk L, Dereure J, ALkiami A, Desjeux P (1998). Infestation naturelle de phlebotomus tobbi par Leishmania donovanis en Syrie. Parasitologia 40 (supple):148-50.

59-Desjeux P (2004). Leishmaniasis current situation and new perspectives. Copm Immunol Microbiol Infect Dis 27(5):305-323.

60-Shabaan M, Nahhas S (2003). Epidemiological of Cutaneous Leishmaniasis of cases from dermatology hospital and general clinic in Damascus. Damas Univ J Bas Sci 19(1):113-124.

61-Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol 32(9):2246-2252.

62-Zijlstra EE, Siddig Ali M, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 86:505-507.

63-Nahhas S (2006). Isoenzyme Typing and Leishmaniasis Diagnosis. J Lab diag 4(2).

64-Andresen K, Gaafar A, El-Hassan AM, Ismail A, Dafalla M, Theander TG, Kharazmi A (1996). Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. Trans R Soc Trop Med Hyg 90:133-135.

65-Arana BA, Roca M, Rizzo NR, Mendoza CE, Kroeger A (1999). Evaluation of a Standardized Leishmanin Skin Test in Guatemala. Trans R Soc Trop Med Hyg Jul-Aug;93:43-45.

66-Kalter DC (1994). Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. Dermatologic clinics 12:37-50.

67-Frankenburg S, Klaus S (1989). Evaluation of a total lymphocyte proliferation assay as a diagnostic tool for cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg Jul-Aug ;83(4):499-502.

68-Alvarado R, Enk C, Jaber K, Schnur L, Frankenburg S (1989). Delayed-type hypersensitivity and lymphocyte proliferation in response to Leishmania major infection in a group of children in Jericho. Trans R Soc Trop Med Hyg 83:189-192.

69-Valli LCP, Passos VMM, Dietze R, Callahau HL, Berman JD, Grogl M (1999). Humoral immune responses among mucosal and Cutaneous Leishmaniasis patients caused by Leishmania brasiliensis. J Parasitol 85:1076-1083.

70-Brito MEF, Mendonca MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC (2001). Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American Cutaneous Leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 95:203-206.

71-Wilson SM (1995). DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: field applications and practicalities. Ann Trop Med Parasitol 89(suppl 1):95-100.

72-Pizzuto M, Piazza M, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, Persico t, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Galli M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S (2001). Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfected with human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol 39(1):357-361.

73-Agostoni C, Dorigoni N, Malfitano A, Caggese L, Marchetti G, Corona S, Gatti S, Scaglia M (1998). Mediterranean leishmaniasis in HIV-infected patients: epidemiological, clinical, and diagnostic features of 22 cases. Infection 26(2):93-99.

74-Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu H (1999). Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze dried antigen for the detection of anti Leishmania antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg 93:275-277.

75-Shaaban M, Hammoud L, Nahhas S (2003). Preliminary Serodiagnosis study to certify the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Syria Damas Univ J Bas Sci 19(2).

76-Nahhas S, Shaaban M, Hammoud L, Al-Taweel A, Al-Jorf S (2003). Use of rk39 Test for the Early Detection of Visceral Leishmaniasis in Syria. Eastern Mediterranean health Journal 9 (4):99-105.

77-Barbosa-de-Deus R, Luyiacute Z, dos Mares-Guia M, Zacarias Nunes A, Morais Costa K, Goncalves Junqueira R, Mayrink W, Genaro O, Pereira Tavares CA (2002). Leishmania major -Like Antigen for specific and sensitive serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. Clin Diag Lab Immun 6 (9):1361-1366.

78-Salotra P, Raina A, Ramesh V (1991). Western blot analysis of humoral immune response to Leishmania donovani antigens in patients with post-kala-azar dermal leishmaniasis. Trans R Soc TropMed Hyg 93(1):98-101.

79-Zorek k (2007). Study of distribution of visceral leishmaniasis antibody in people with high risk at epidemical areas in Idleb. Dissertation to obtain MA degree. Faculty of medicine. Damascus University.

80-Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB (2001). Use of the recombinant rK39 dipstick test and the direct agglutination test in sitting endemic for VL in Nepal . Am J Trop Med Hyg 65 (5):403-404.

81-Delgado O, Feliciangeli MD, Arias J (2001). Value of dipstick based on recombinant Rk39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. Parasite 8(4):355-357.

82-Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J (1990). Taxonomy of Leishmania , use of Isoenzymes. Suggestions for a new classification. Annls Parasitol Hum Comp 65:111-125.

83-Gramiccia M, Ben-Ismael R, Gradoni L, Ben Rachid MS, Ben Said M (1991). A Leishmania infantum enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg 85(3):370-371.

84-Pinto-da-Silva LH, Fampa P, Soares DC, Oliveira SM, Souto-Padron T, Saraiva EM , Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Farault –Gambarelli F, Derreure J, Lanotte G, Dedet JP (2004). Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of Leishmania infantum in the south of France and relationship of Enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J Clin Microbiol 42(9):4077-4082.

85-Zhang WW, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Nado M, Ward B, Llanos-Cuentas A, Matlashewski G (2006). Development of a genetic assay to distinguish between Leishmania Vianna speices on the basis of isoenzyme differences. Clin Infect Dis Mar 15;42(6):801-809.

86-Lambson B, Smyth A, Barker DC (2000). Leishmania donovani: Development and characterization of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. Exp Parasitol 94:15-22.

87-Bensoussan E, Nasereddin A, Jonnas F, Schnur LF, Jaffe CL (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Apr;44(4):1435-1439.

88-Oliveira JG, Novais FO, De Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JM, Barral A (2005). Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. Acta Trop 94(1):55-59.

89-Nasereddin A, Ereqat S, Azmi K, Baneth G, Jaffe CL, Abdeen Z (2006). Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. J Parasitol Feb;92(1):178-183.

90-Martin –Sanchez J, Pineda JA, Morillas-Marquez F, Garcia-Garcia JA, Acedo C, Mascias J (2004). Detection of Leishmania infantum at risk for parenterally transmitted infections; relationship between polymerase chain reaction results and other leishmania infection markers. Am J Trop Med Hyg 70(5):545-548.

91-Jirku M, Zemanova E, Al-jawabrah A, Schonian G, Lukes J (2006). Development of direct specific-specific PCR assay for differential diagnosis of Leishmania tropica. Diagn Microbiol Infect Dis May ;55(1):75-79.

92-Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schalling HD, Presber W, Jaffee CL (2003). PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbial Infect Dis 47(1):349-358.

93-Gutiérrez-Solar B, Smyth AJ, Alvar J, Barker DC (1995). Leishmania infantum: Sequence homology within minicircle classes regardless of geographical distances. Exp Parasitol 81:416-419.

94-Selvapandiyan A, Duncan R, Mendez J, Kumar R, Salotra P, Cardo LJ, Nakhasi HLA (2008). Leishmania minicircle DNA footprint assay for sensitive detection and rapid speciation of clinical isolates. Transfusion Sep;48(9):1787-1798.

95-Nasereddin A, Azmi K, Jaffe CL, Ereqat S, Amro A, Sawalhah S, Baneth G, Schönian G, Abdeen Z (2009). Kinetoplast DNA heterogeneity among Leishmania infantum strains in central Israel and Palestine. Vet Parasitol Apr 6;161(1-2):126-130.

96-Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I (2002). Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of Leishmania mexicana. Parasitol Res 88(10):918-925.

97-El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schoenian G (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical sample of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 94:575–579 .

98-Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schönian G, Farajnia S, Alimohammadian MH (2006). Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolated by single –strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop Apr;98(1):52-58.

99-Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger A (2003). Identification and Differentiation of Leishmania Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J Clinic Microbiol July;41(7):3147-3153.

100-Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA (2004). Leishmania donovani complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. Parasitology. Mar;128(Pt 3):263-267.

101-Dawoud HA (2004). Identification of cutaneous leishmaniasis in Egypt by hybridization of PCR amplified mini-exon repeats. J Egypt Soc Parasitol. Dec;34(3):881-892.

102-Martinz E, Alonso V, Quispe A, Thomas MC, Alonso R, Pinero JE, Gonzalez AC, Ortega A, Valladares B (2003). RAPD method useful for distinguishing leishmania speices: design of specific primers for L.brazilienesis. Parasitolgy 127 (6):513-517.

103-Schonian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Graser Y, Presber W (1996). Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus Leishmania using single primers in the polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 77:19–29.

104-Eisenberger CL, Jaffe CL (1999). Leishmania: identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. Exp Parasitol 91:70–77.

105-Andrade HM, Reis AB, Dos Santos SL Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ (2006). Use of PCR –RFLP to identify Leishmania speices in naturally- infected dogs. Vet Parasotol 140(3-4):231-238.

106-Ferroglio E, Romano A, Trisciuoglio A (2006). Characterization of leishmania infantum strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. Trans R Soc Trop Med Hyg Jul;100(7):636-641.

107-Hu Xs, Yang WT, Lu HG, Yan HP (2000). Sequencing a specific Kintoplast DNA fragment of Leishmania donovani for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. J Parasitol 86(4):882-886.

108-Alkhawajah A (1998). Recent trends in the treatment of cutaneous leishmaniasis. Ann Saudi Med Sep-Oct;18(5):412-416.

109-Davidson RN (1998). Practical guide for the treatment of leishmaniasis. Drugs Dec;56(6):1009-1018.

110-Daoud S.(1994). Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by Physical Methods Ar Ed Zeizaphon, SH for MD Research,Damascus.

111-Junaid AJ (1986) .Treatment of cutaneous leishmaniasis with infra-red heat. Int J Dermatol 25(7):470-472.

112-Reithinger R, Mohsen M, Wahid M, Bismullah M, Quinnell RJ, Davies CR, Kolaczinski J, David JR (2005). Efficacy of Thermotherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania tropica in Kabul, Afghanistan: A Randomized Controlled Trial. Clinical Infectious Diseases 40:1148–1155.

113-Gardlo K, Hanneken S, Ruzicka T, Neumann NJ (2004). Photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. A promising new therapeutic modality. Hautarzt 55:381–383.

114-Karrer S, Szeimies RM (2007). Photodynamic therapy: non –oncologic indications. Hautarzt Jul;58(7):585-596.

115-Sharquie KE, Hammamy H, El-Yasin D (1998). Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: the Baghdadin device. J Dermatol 25:234-237.

116-Braun Falco O, Wolff HH, Plewig G, Winkelmann RK (1995). "Disease caused by Protozoa. Dermatology, Berlin: Springer-Verlag, PP 180-185.

117-Ameen M (2007). Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. Expert Opin pharmacother Nov;8(16):2689-2699.

118-Croft SL, Yardly V (2002). Chemotherapy of Leishmaniasis. Cuee Pharm Des 8(4):319-342

119-Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber M (2006). Leishmanisis vaccine candidates for development a global overview. Indian J Med Res 123:423-438.

120-Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi R , Dowlati LY, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki RK, Nasseri T, Godal P, Smith G, Modabber F (1999). A randomised double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Vaccine 17:466-472.

121-Machado-pinto J, Markques MJ (2002). Immunochemotherapy for cutaneous leishmanisis: a controlled trial using killed leishmania amazonesis vaccine plus antimonial. Int J Dermatol 41(2):73-78.

122-Kubar J, Fragaki K (2005). Recombinant DNA-derived Leishmania proteins :from the laboratory to the field. Lancet Infect Dis 5:107-114

123-Killick –Kendrich R, Killick –Kendrich M (1999). Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine Leishmaniasis .canine Leishmaniasis: an update proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum. Barchalona,Spain. pp.26-31

124-Naucke TJ, Lorenz S, Grunewald HW (2006). Laboratory testing of the insect repellents IR 3535(R) and DEET against phlebotomus mascittii and P duboscqi (Diptera:Psychodidate). Int J Med Microbiol 296(suppl 1):230-232.

125-Kroeger A, Avila EV, Morison L (2002). Insecticide impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leiushmaniasis in Venezuela: cluster randomized trial. BMJ Oct 12;325(7368):810-813.

126-Den Dunnen JT (2008). "Recommendations for the description of sequence variants". Human Genome Variation Society. http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html. Retrieved on 2008-09-05.

127-Purcell S, Daly MJ, Sham PC (2007)."WHAP: haplotype-based association analysis". Bioinformatics 23:255–256.

128-Hedrick PW, Kumar S (2001). "Mutation and linkage disequilibrium in human mtDNA". Eur J Hum Genet 9(12):969–972

129-Hartl N, Daniel L, Elizabeth W. Jones H (2005). Essential genetics: A genomics perspective (4th ed). Jones & Bartlett Publishers. p. 53.

130-Bruce Carlson (15 June 2008). "SNPs — A Shortcut to Personalized Medicine". Genetic Engineering & Biotechnology News (Mary Ann Liebert, Inc.): p.12. http://www.genengnews.com/articles/chitem.aspx?aid=2507. Retrieved on 6 July 2008. "(subtitle) Medical applications are where the market's growth is expected".

131-Matsushita M, Fujita T (2001). Ficolins and the lectin complement pathway. Immunol Rev 180:78–85.

132-Ichijo H, Ronnstrand L, Miyagawa K, Ohashi H, Heldin CH, Miyazono K (1991). Purification of transforming growth factor-beta 1 binding proteins from porcine uterus membranes. J Biol Chem 266:22459–22464.

133-Ichijo H, Hellmanm U, Wernstedtm C, Gonez L J, Claesson-Welsh L, Helden, C H, Miyazono K (1993). Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. J Biol Chem 268:14505–14513.

134-Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakta M, Mizuouchi T (1996). A novel human serum lectin with collagen- and fibirinogen-like domains that functions as an opsonin. J Biol Chem 271:2448–2454.

135-Endo Y, Sato Y, Matsushita M , Fujita T (1996). Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. Genomics 36:515–521

136-Lu J, Tay PN, Kon OL, Reid KB (1996). Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. Biochem J 313:473–478.

137-Inaba S, Okochi K, Yae Y, Niklasson F, de Verder CH (1990). Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system.Fukuoka Igaku Zasshi 81:284–291.

138-Sugimoto R, Yae Y, Akaiwa M, Kitajima S, Shibata Y, Sato H, Hirata J, Okochi K, Izuhara K, Hamasaki N (1998). Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the Ficolin/opsonin p35 lectin family. J Biol Chem 273:20721–20727.

139-Inaba S, Okochi K (1978). On a new precipitating antibody against normal human serum found in two patients with SLE (in Japanese). Igaku No Ayumi 107:690–691.

140-Fujimori Y, Harumiya S, Fukumoto Y, Miura Y, Yagasaki K, Tachikawa H, Fujimoto D (1998). Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A. Biochem Biophys Res Commun 244:796–800.

141-Ohashi T, Erickson HP (1998). Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. Arch Biochem Biophys 360:223–232.

142-Ohashi T, Erickson, HP (1997). Two oligomeric forms of plasma ficolin have differential lectin activity. J Biol Chem 272:14220–14226.

143-Omori-Satoh T, Yamakawa Y, Mebs D (2000). The anti hemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (Erinaceus europaeus), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. Toxicon 38:1561–1580.

144-Kakinuma Y, Endo Y, Takahashi M, Nakata M, Matsushita M, Takenoshita S, Fujita T (2003). Molecular cloning and characterization of novel ficolins from Xenopus laevis. Immunogenet 55:29–37.

145- Kenjo A, Takahashi M, Matsushita M, Endo Y, Nakata M, Mizuochi T, Fujita T (2001). Cloning and characterizationof novel ficolins from the solitary ascidian, Halocynthia roretzi. J Biol Chem 276:19959–19965.

146-Francis k , Beek JV, Canova C, Neal JW, Gasque P (2003). Structure and interactions of C1q. Expert Reviews in Molecular Medicine May Vol 5:23.

147-Thiel S (2007). Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. Molecular Immunology 44:3875–3888

148-Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO (2006). Mannose-binding lectin and its genetic variants. Genes and Immunity 7:85-94

149-Fujita T (2002). Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. Nature Reviews Immunology 2:346-353.

150-Garlatti V, Belloy N, Martin L, Lacroix M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T, Fontecilla-Camps J, Arlaud G, Thielens N, Gaboriaud C (2007). Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H ficolins. EMBO J 26:623–633.

151-Ohashi T, Erickson HP (2004). The disulfide bonding pattern in ficolin multimers. J Biol Chem 279:6534–6539.

152-Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen H O, Fujita T, Matsushita M, Garred P, (2005). Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. Human Mol Genet 14:1651–1658.

153-Runza VL, Schwaeble W, Mannel DN (2008). Ficolins: Novel pattern recognition molecules of the innate immune response. Immunobiology 213:297–306

154-Endo Y, LiuY, Kanno K, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T (2004). Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. Genomics 84:737–744.

155-Endo Y, Matsushita M, Fujita T (2007). Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. Immunobiology 212:371–379

156-Teh C, Le Y, Lee SH, Lu J (2000). M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of Escherichia coli. Immunology 101:225–232.

157-Garred P, Honoré C, Ma Y J, Munthe-Fog L, Hummelshǰ T (2009). MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. Molecular Immunology 46:2737–2744.

158-Honore C, Rorvig S, Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Madsen HO, Borregaard N, Garred P (2008). The innate pattern recognition molecule ficolin-1 is secreted by monocytes/ macrophages and is circulating in human plasma. Mol Immunol 45:2782–2789.

159-Thiel S, Jensen L, Nielsen HJ, Jensenius JC (2010). Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma. J Innate Immun 2:167-180.

160-Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Sim RB, Garred P (2008). Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). Mol Immunol 45:1623–1632.

161-Taira S, Kodama N, Matsushita M, Fujita T (2000). Opsonic function and concentration of human serum ficolin/P35. Fukushima J Med Sci 46:13–23.

162-Kilpatrick DC, Fujita T, Matsushita M (1999). P35, an opsonic lectin of the ficolin family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients. Immunol Lett 67:109–112.

163-Atkinson AP, Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko A S, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, Matsushita M, Turner ML, Kilpatrick DC (2004). L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. Clin Exp Immunol 138:517–520.

164-Akaiwa M, Yae Y, Sugimoto R, Suzuki SO, Iwaki T, Izuhara K, Hamasaki N (1999). Hakata antigen, a new member of the Ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. J Histochem Cytochem 47:777–785.

165-Kuraya M, Matsushita M, Endo Y, Thiel S, Fujita T (2003). Expression of H-ficolin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. Int Immunol 15:109–117

166-Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Ma YJ, Hansen BE, Koch C, Madsen HO, Skjodt, K, Garred P (2008). Characterization of polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. Mol Immunol 45:2660–2666.

167-YaeY, Inaba S, Sato H, Okochi K, Tokunaga F, Iwanaga S (1991). Isolation and characterization of a thermolabile beta-2 macroglycoprotein (‘thermolabile substance’ or ‘Hakata antigen’) detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus. Biochim Biophys Acta 1078:369–376.

168-Liu Y, Endo Y, Nakata M, Wada I, Iwaki D, Inoue K, Matsushita M, Munakata M, Fujita T (2005). Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. J Immunol 175:3150–3156.

169-Krarup A, Thiel, S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC (2004). L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. J Biol Chem 279:47513–47519.

170-Lynch NJ, Roscher S, Hartung T, Morath S, Matsushita M, Maennel DN, Kuraya M, Fujita, T, Schwaeble WJ (2004). L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. J Immunol 172:1198–1202.

171-Kadirvelraj R, Gonzalez-Outeirino J, Foley BL, Beckham ML, Jennings HJ, Foote S, Ford MG, Woods RJ (2006). Understanding the bacterial polysaccharide antigenicity of Streptococcus agalactiae versus Streptococcus pneumoniae. Proc Natl Acad Sci USA 103:8149–8154.

172-Aoyagi Y, Adderson EE, Min JG, Matsushita M, Fujita T, Takahashi S, Okuwaki Y, Bohnsack JF (2005). Role of l-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group B streptococci. J Immunol 174:418–425.

173-Wang X, Rocheleau TA, Fuchs JF, Christensen BM (2006). Beta 1, 3-glucan recognition protein from the mosquito, Armigeres subalbatus, is involved in the recognition of distinct types of bacteria in innate immune responses. Cell Microbiol 8:1581–1590.

174-Pelletier I, Hashidate T, Urashima T, Nishi N, Nakamura T, Futai M, Arata Y, Kasai K, Hirashima M, Hirabayashi J, Sato S (2003). Specific recognition of Leishmania major poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between L. major and host cells. J Biol Chem 278:22223–22230.

175-Kuraya M, Ming Z , Liu X, Matsushita M, Fujita T (2005). Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. Immunobiol 209:689–697.

176-Jensen ML, Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Garred P (2007). Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. Mol Immunol 44:856–865

177-Matsushita M, Fujita T, Lee BL (2004). Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. J Biol Chem 279:25307–25312.

178-Krarup A, Sorensen UB, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S (2005). Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. Infect Immun 73:1052–1060.

179-Tsujimura M, Miyazaki T, Kojima E, Sagara Y, Shiraki H, Okochi K, Maeda Y (2002). Serum concentration of Hakata antigen, a member of the ficolins, is linked with inhibition of Aerococcus viridans growth. Clin Chim Acta 325:139–146.

180-Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P, Garred P (2007). The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. Arthrit Rheum 56:1598–1607

181-Tanio M, Kondo S, Sugio S, Kohno T (2007). Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. J Biol Chem 282:3889–3895.

182-Matsushita M (2010). Ficolins: Complement-Activating Lectins Involved in Innate Immunity. J Innate Immun 2:24–32.

183-Lu J, The C, Kishore U, Reid K BM (2002). Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. Biochimica et Biophysica Acta 1572:387–400.

184-Matsushita M (1996). The lectin pathway of the complement system. Microbiol Immunol 40: 887–893.

185-Matsushita M, Fujita T (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. J Exp Med 176:1497–502.

186-Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K (1997). A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 386:506–510.

187-Dahl MR, Thiel S, Willis C, Vorup-Jensen T, Christensen T, Petersen SV. Mannan-binding lectin associated serine protease 3 sMASP-3—a new component of the lectin pathway of complement activation. The 18th International Complement Workshop. USA: Snowbird, 2000.

188-Takahashi M, Endo Y, Fujita T, Matsushita M (1999). A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease sMASP-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. Int Immunol 11:859–863.

189-Stover CM, Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Schwaeble W (1999). Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. J Immunol 162:3481-3490.

190-Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T (2000). Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. J Immunol 165:2637–2642.

191-Matsushita M, Endo Y, Fujita T (2000). Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. J Immunol 164:2281–2284.

192-Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T (2002). Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). J Immunol 168:3502–3506.

193-Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC (2005). M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. Scand J Immunol 62:462–473.

194-Sotiropoulou G, Kono M, Anisowicz A, Stenman G, Tsuji S, Sager R (2002). Identification and functional characterization of a human GalNAc [α]2,6-sialyltransferase with altered expression in breast cancer. Mol Med 8:42-55.

195-Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature 452:103–107.

196–Ng PM, Le Saux A, Lee CM, Tan NS, Lu J , Thiel S, Ho B, Ding JL (2007). C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. EMBO J 26:3431–3440.

197-Zhang J, Koh J, Lu J, Thiel S, Leong BS, Sethi S, He CY, Ho B, Ding JL (2009). Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response. PLoS Pathog January; 5(1): e1000282.

198-Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Garred P (2008). Functional SNPs in the human ficolin (*FCN*) genes reveal distinct geographical patterns. Mol Immunol 45: 2508–2520.

199-Vander CB, Nuytinck L, Boullart L, Elewaut D,Waegeman W, Van T M, De ME , Lebeer K, Rossau R, De KF (2007). Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1)are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. Rheumatology 46:1792–1795.

200-Schlapbach LJ, Kessler U, Thiel S, Hansen AG, Nelle M, Ammann RA, Aebi C, Jensenius JC (2009). M-ficolin in the neonatal period: associations with need for mechanical ventilation and mortality in premature infants with necrotising enterocolitis. Mol Immunol 46:2597–2603.

201-Herpers BL, Immink MM , de Jong BA, van Velzen-Blad H, de Jongh BM, van Hannen EJ (2006) .Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. Mol Immunol 43: 851–855.

202-Garred P, Honoré C,Ma YJ, Rřvig S, Cowland J, Borregaard N, Hummelsh T.(2009). The Genetics of Ficolins. J Innate Immun Dec;2(1):3-16.

203-Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Hansen BE, Koch C, Madsen HO, Skjodt K, Garred P(2007). The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. Scand J Immunol 65:383–392.

204-Chen X, Katoh, Y, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Endo Y, Fujita T,Nishida T, Mizuki N (2006). Single nucleotide polymorphisms of Ficolin2 gene in Behcet’s disease. J Dermatol Sci 43:201–205.

205-Cedzynski M, Nuytinck L, Atkinson AP, St Swierzko A, Zeman K, Szemraj J, Szala A, Turner ML, Kilpatrick DC (2009). L-ficolin (ficolin-2) insufficiency is associated with combined allergic and infectious respiratory disease in children. Molecular Immunology 47:415–419.

206-Chapman SJ, Vannberg FO, Khor CC, Segal S, Moore CE, Knox K, Day NP, Davies RJ, Crook DW, Hill AV (2007). Functional polymorphisms in the FCN2 gene are not associated with invasive pneumococcal disease. Mol Immunol 44:3267–3270.

207-Kilpatrick DC, McLintock LA, Allan EK, Copland M, Fujita T,Jordanides NE, Koch C, Matsushita M, Shiraki H, Stewart K, Tsujimura M, Turner ML, Franklin IM,

Holyoake TL (2003). No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. Clin Exp Immunol 134:279–284.

208-Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M., Macdonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A , Szczapa J , Matsushita M, Szemraj J , Turner ML, Kilpatrick DC (2009). Two factors of the lectin pathway of complement, L-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, lowbirthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. Mol Immunol 70:68–72.

209-Wang CC, Yim, KW, Poon TCW, Choy KW, Chu CY, Lui WT, Lau TK, Rogers MS, Leung TN (2007). Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia. Clin Chem 53:42–52.

210-Svendsen, C B, Hummelshoj T, Munthe-Fog, L, Milman N, Garred P, Laursen IA, Christiansen M, Krogfelt K (2008). Ficolins and mannosebinding lectin in Danish patients with sarcoidosis. Respir Med 102: 1237–1242.

211-Messias-Reason I, Kremsner PG, Kun JF (2009). Functional haplotypes that produce normal ficolin-2 levels protect against clinical leprosy. J Infect Dis 199:801–804.

212-Messias-Reason I, Schafranski MD ,Kremsner PG, Kun JF (2009). Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. Clin Exp Immunol 157:395–399.

213-Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Ma YJ, Honore C, Madsen HO, Permin H, Garred P (2009). Immunodeficiency Associated with FCN3, Mutation and Ficolin-3 Deficiency. N Engl J Med 360:2637-2644.

214-Fukutomi T, Ando B, Sakamoto S, Sakai H, Nawata H (1996). Thermolabile β-2 macroglobulin (Hakata antigen) in liver disease: biochemical and immunohistochemical study. Clin Chim Acta.255:93–106.

215-Andersen T Munthe-Fog, L. Garred, P, Jacobsen S (2009). Serum levels of ficolin-3 (Hakata antigen) in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol Apr;36(4):757-759.

216-Ruskamp JM, Hoekstra MO, Postma DS, Kerkhof M, Bottema RW, Koppelman GH, Rovers MM, Wijga AH, de Jongste JC, Brunekreef B, Sanders EA (2009). Exploring the role of polymorphisms in ficolin genes in respiratory tract infections in children. Clin Exp Immunol 155:433-440.

217-Schlapbach LJ, Aebi C, Hansen AG, Hirt A, Jensenius JC, Ammann RA (2009). H-ficolin serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in pediatric cancer patients. Clin Exp Immunol Jul;157(1):83-89.

218-Nielsen RG, Vind I, Munkholm P, Jensenius JC, Thiel S, Husby S (2007). Genetic polymorphisms of mannan binding lectin (MBL), serum levels of MBL, the

MBL associated serine protease and H-ficolin in patients with Crohn's disease. Gut 56:311-312.

219-Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J (2004). Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient?. Trends in Parasitology 20:297-301.

220-Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005). Advances in leishmaniasis. Lancet 366:1561-1577.

221-Sacks D, Sher A (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immuno l3:1041-1047.

222-Sakthianandeswaren A, Foote S J, Handman E (2009). The role of host genetics in leishmaniasis. Trends Parasitol 25:383-391.

223-Faik I, Oyedeji SI, Idris Z, Messias-Reason I ,Lell B ,Kremsner PG ,Kun JF (2011). Ficolin-2 levels and genetic polymorphisms of FCN2 in malaria. Hum Immunol Jan;72(1):74-79.

224-Gangneux JP, Sulahian A, Honore S, Meneceur P, Derouin F, and Garin YJ (2000). Evidence for determining parasitic factors in addition to host genetics and immune status in the outcome of murine Leishmania infantum visceral leishmaniasis. Parasite Immunol 22:515-519.

225-Ogden C A, deCathelineau A, Hoffmann P R, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok V A, Henson PM (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med 194:781-795.

226-Lacroix M, Dumestre-Perard C, Schoehn G, Houen G, Cesbron J Y, Arlaud G J, Thielens NM(2009). Residue Lys57 in the collagen-like region of human L-ficolin and its counterpart Lys47 in H-ficolin play a key role in the interaction with the mannan-binding lectin-associated serine proteases and the collectin receptor calreticulin. J Immunol 182:456-465.

227-de Miranda Santos IKF, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, Gomes R B, Weiner D L, Harn D A, Ezekowitz RA, Epstein JE (2001). Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infect Immun 69(8):5212-5215.

228-Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. Mol Biochem Parasitol 66:319–328.

229-Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE, de Miranda Santos IK, do Socorro Pires e Cruz M, Aécio de Carvalho F, Abatepaulo AR, Lamounier Costa D, Werneck GL, Farias TJ, Soares MJ, Costa CH (2007). Genotypes of the Mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. The Journal of Infectious Diseases 195(8):1212-1217.

230-Asgharzadeh M, Mazloumi A, Kafil HS, Ghazanchaei A (2007). Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum. Pak J Biol Sci Jun 1;10(11):1850-1854.

231-Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A (1994). Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis?. Eur J Immunogenet 21:125-131.

232-Hellemann D, Larsson A, Madsen H O, Bonde J, Jarlov J O, Wiis J, Faber T, Wetterslev J, Garred P (2007). Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. Hum Mol Genet 16:3071-3080.

233-Allisona C (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. British Medical Journal 1,290.

234-dos S.Cestari I, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI (2009). Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of Trypanosoma cruzi. Mol Immunol 47:426-437.

الملخص باللغة الانكليزية

FCN gene polymorphism in patients with cutaneous leishmaniasis

Leishmaniasis poses a serious health threat in many tropical and subtropical countries with estimates of 350 million people at risk and 12 million people affected. Despite considerable efforts to control the disease the incidence worldwide is still on the rise**,** Even though there is a clear correlation between the causative species and the clinical presentation, many variations are seen depending on the immunocompetence of the host. Here we aimed to investigate the contribution of ficolin 2 (FCN-2) polymorphisms to susceptibility and clinical progression of cutaneous leishmaniasis. FCN2 is an important factor of the innate immune response and its gene is located on chromosome9q34 and contains 8 exons It has been recently shown that FCN-2 is highly polymorphic and that low level of circulating protein are clearly associated with polymorphisms in the promoter (-986, -602, -4) and in exon 8 (+6424).

A total of 235 patients presenting different clinical outcomes of cutaneous Leishmaniasis from Syria were included in the study. They were consecutive outpatients from different dermatologic clinics in Syria. All patients were diagnosed with cutaneous leishmaniasis according to Giemsa staininig of dermal scrapings from affected lesions. Two hundred and thirty two healthy unrelated symptom-free subjects were assessed as controls. Both patients and controls belonged to the same social status and geographical area.

DNA extraction was performed using QIAampTM DNA extraction kits. The entire coding regions of the gene were amplified in 40 control individuals and analyzed by DNA sequencing. The resulting DNA sequences were aligned using Bio-Edit software, and DNA polymorphisms were confirmed visually from sequence electropherograms.

The determination of polymorphisms at -986G>A and -602G>A and (-4A>G) in the promoter region were done by TaqMan-Based Real-Time PCR. Whereas the position +6424 G>T was assessed by DNA sequencing. The TaqMan-Based Real-Time PCR technique is based on amplification of the region flanking the SNP in the presence of two allele-specific fluorescent probes, of which the 5´end is labelled with a reporter dye (either FAM or YAK) and the 3´ end is labelled with a quencher. samples were

analyzed on Rotor-Gene 3000 using Rotor-Gene software v 6. 1. the results were analyzed by statistical program (haploview, Arlequin and ststa).

Nine novel SNPs were identified: two in the promoter (-722 C>T, -418 G>A), one in intron 2 (+1898 G>C), four in intron 5 (+4577C>G, +4647 C>T, +4704 G >C, +4806 G>A), one in exon 6 (+4986 C>T) causing a Arg to Trp exchange and one in exon 8 (+6584 G>A) causing a change at position 311 from Arg to Gln. In the Syrian cohort strong allelic combinations at (-986 and -4) and at (-557 and -64) were observed.. The AGA haplotype was significantly decreased in the healthy control in comparison to the patients (p=0.036, OR= 1. 7, CI 95% 1 – 3). If the promoter polymorphisms were combined with the exon 8 (+6424) polymorphism the different distribution of the seven found haplotypes were still statistically significant between the groups (p=0.036) The AGAG haplotype, known to be associated with normal levels of circulating FCN2, was significantly decreased in healthy control when compared to leishmaniasis patients (p=0.036, OR= 1. 7, CI95% 1 – 3).

These results suggest that FCN2 exert similar functions as MBL during interaction with Leishmania. Thus FCN-2 deficiency might play an advantageous role in the protection against Leishmania. It seems also that selective forces have exerted positive selective pressure on FCN-2 haplotypes that would be protective for the disease. Of course, it might be possible that other diseases exerts the selective force on the *FNC2* polymorphisms and Leishmania profits from the selective process.

In conclusion we present evidence that FCN2 may be an additional factor contributing to the facilitation of invasion of Leishmania into macrophages. Although the role of Ficolin-2 in the interaction with the Leishmania surface remains to be established, these results indicate a role for this molecule in leishmaniasis and represent another example how seemingly deleterious polymorphism can be beneficial in a population. The association of the specific haplotype is rather weak and the number of patients is low therefore additional studies with larger cohorts of leishmaniasis would be desirable.

الاختصارات

مستقبل الجزء C1q من المتممة	cC1qR
أمراض القلب الروماتويدية المزمنة	CHRD
ليشمانية جلدية	CL
معامل اختلال التوازن الارتباطي	D'
اختبار التراص المباشر	DAT
الليشمانية الجلدية المنتشرة	DCL
نوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين المفلورة	ddNTPs
نوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين	dNTPs
العامل المفرز	EF
المقايسة بطريقة الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم	ELISA
الفيكولين	FCN
N أسيتيل غالاكتوز أمين	GalNAc
N -أسيتيل غلوكوز أمين	GlcNAc
اختبار شريط الاستشراب المناعي	ICT
اختبار التألق المناعي	IFA
انترلوكين	IL
انترفيرون	INF
الفراغات البينية المشفرة	ITS
دنا الصانعة المحركة	KDNA
ليشمانيا	L
اختلال التوازن الارتباطي	LD
لغاريتم نسبة الأرجحية	LOD

LPA	اختبار تكاثر اللمفاويات
LTA	الليبوتكويك أسيد
MAC	معقد مهاجمة الغشاء
MASP	البروتياز المرافقة للبروتين الرابط للمانوز
MBL	البروتين الرابط للمانوز
MCL	الليشمانية الجلدية المخاطية
MHC	معقد التوافق النسيجي الكبير
NCBI	المركز العالمي لمعلومات التكنولوجيا البيولوجية
P	فاصدة
PAMPs	الجزيئات المرافقة للعوامل الممرضة
PCR	التفاعل السلسلي البوليميرازي
PKDL	الليشمانية الجلدية التالي للكلآزار
RF	حمى الروماتزم
RFLP	تقانة الإقتطاع الإنزيمي
SNP	التعدد الشكلي في أساس آزوتي وحيد
ssuRNA	رنا الريبوزومي بتحت وحدته الصغيرة
TCR	مستقبلات الخلايا التائية
Th	التائيات المساعدة
TNF	عامل نخرة الأورام
VL	ليشمانية حشوية
WB	البقعة الغربية
WHO	منظمة الصحة العالمية